

AUS DEM INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE
ARBEITSGRUPPE FÜR ZELLCHEMIE
LEITER: PROF. DR. W. G. HANSTEIN

**Charakterisierung einer Ligandenstelle
des menschlichen Serumalbumin
mit Hilfe von 2-Azido-4-nitrophenolat**

DISSERTATION

zur Erlangung eines Doktorgrades der Medizin
der Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

HARALD THEODOR TOMSIK

aus Hagen

~~1983~~
1984

AUS DEM INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE
ARBEITSGRUPPE FÜR ZELLCHEMIE
LEITER: PROF. DR. W. G. HANSTEIN

**Charakterisierung einer Ligandenstelle
des menschlichen Serumalbumin
mit Hilfe von 2-Azido-4-nitrophenolat**

DISSERTATION

zur Erlangung eines Doktorgrades der Medizin
der Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

HARALD THEODOR TOMSIK

aus Hagen

1983

AUS DEM INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE
ARBEITSGRUPPE FÜR ZELLCHEMIE
LEITER: PROF. DR. W. G. HANSTEIN

Charakterisierung einer Lipidtransferase
des menschlichen Spermatozoen
mit Hilfe von 8-alkyl-4-nitrophenol

DISSERTATION

zur Erlangung eines Doktorgrades der Medizin
der Abteilung für Biochemie und Zellphysiologie
der Philipps-Universität Marburg

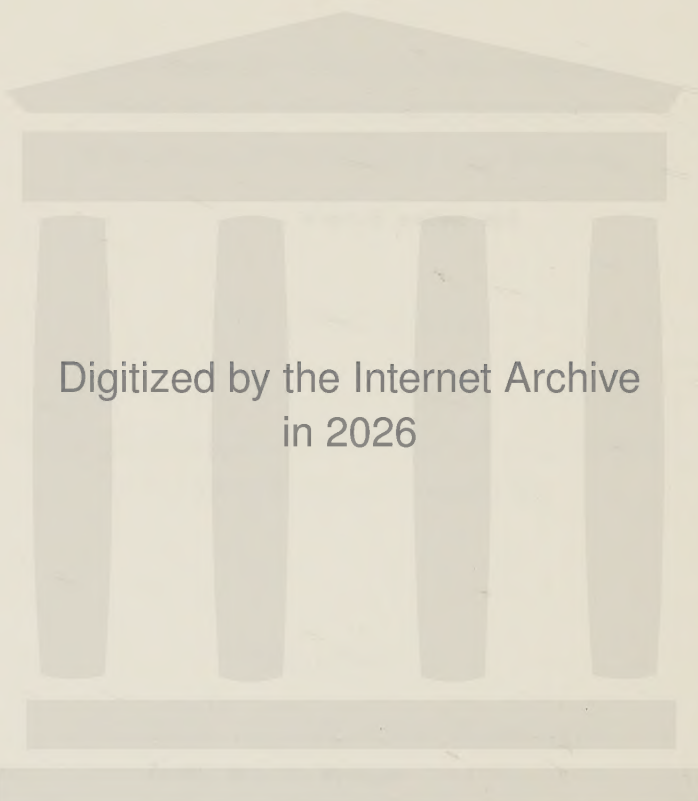
vorgelegt von

HARALD THEODOR FOMSKA

Dekan: Prof. Dr. J. Werner
Referent: Prof. Dr. W. G. Hanstein
Korreferent: Prof. Dr. Heilmann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 1984

Für meine Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546407_0007

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Abkürzungen	8
3	Material und Methoden	9
3.1	Geräte	9
3.2	Chemikalien	9
3.3	Methoden	10
3.3.1	Bestimmung der Assoziationskonstanten für die Bindung von NPA an HSA	10
3.3.2	Verdrängung des NPA von HSA	11
3.3.3	Modifizierung von HSA	11
3.3.3.1	HSA-Modifizierung durch NPS	11
3.3.3.2	HSA-Modifizierung durch Acetylsalicylsäure ...	12
3.3.4	Pepsin-Spaltung von mit ^3H -NPA markiertem BSA und deren Auswertung	13
3.3.4.1	Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode	13
3.3.4.2	Synthese von halb-cystinyl BSA	13
3.3.4.3	BSA-Markierung mit ^3H -NPA	14
3.3.4.4	BSA-Spaltung durch Pepsin	14
3.3.4.5	Gelelektrophorese	15
4	Ergebnisse	17
4.1	Bindung von NPA an HSA	17
4.1.1	Titration der Bindung	17
4.1.2	Meßverfahren zur Bestimmung der Assoziations- konstanten	19
4.1.2.1	Bestimmung von α	22
4.1.3	Thermodynamik	23
4.1.3.1	Abschätzung der Meßgenauigkeit für ΔH und ΔS .	25
4.2	Verdrängung des NPA vom HSA	28
4.2.1	Meßverfahren	28
4.2.1.1	modifizierte Dixon-Auftragung	28

4.2.1.1.1	Bestimmung von β	32
4.2.1.2	Hill-Auftragung	34
4.2.1.2.1	Bestimmung der Dissoziationskonstanten für I-HSA aus der Hill-Auftragung	35
4.2.2	Phenylbutazone, Indomethacin	35
4.2.3	Barbiturate	39
4.2.4	Sulfonamide	43
4.2.5	Salicylate	45
4.2.6	Cumarinderivate	50
4.2.7	Penicilline	55
4.3	NPA-Bindung an modifiziertem HSA	60
4.3.1	NPA-Bindung an durch NPS modifiziertem HSA ...	60
4.3.2	NPA-Bindung an durch Acetylsalicylsäure modi- fiziertem HSA	60
4.4	Pepsin-Spaltung von mit ^3H -NPA markiertem BSA	63
5	Diskussion	69
5.1	Bindung von NPA an HSA	69
5.1.1	Meßverfahren	69
5.1.2	Bindungsmechanismus	72
5.1.3	Lokalisierung der NPA-Bindungsstelle	73
5.1.3.1	Lokalisierung durch Phenylbutazone	73
5.1.3.2	Lokalisierung durch HSA-Modifikation	75
5.1.3.3	Lokalisierung durch enzymatische Spaltung	78
5.2	Liganden der Warfarinstelle	80
6	Zusammenfassung	85
7	Literatur	86

1 EINLEITUNG

Mit der in medizinischen Laboratorien üblichen Papierelektrophorese läßt sich menschliches Plasma in folgende Fraktionen zerlegen: Albumin (59%), α_1 -Globulin (4%), α_2 -Globulin (7,5%), β -Globulin (12%) und γ -Globulin (17,5%) (nach WEISS, 1977). Dem in einer Serumkonzentration von 35-50 g/l vorliegenden Hauptprotein Albumin kommen vorwiegend folgende Funktionen zu: Albumin reguliert die Wasserverteilung zwischen dem Intra- und Extravasalraum, da es für 80% des kolloidosmotischen Druckes im Blut verantwortlich ist, hat Nährfunktion für periphere Gewebe, ist eine, wenn auch nur schwache, Puffersubstanz und transportiert im Plasma insbesondere gering wasserlösliche Stoffe (PETERS, 1975).

Nach der von MELOUN et al. (1975) aufgedeckten Primärstruktur besteht HSA aus 585 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 66500.

BROWN (1976) zufolge bildet die Aminosäurenkette drei Einheiten, die jeweils aus einer mittleren kleineren und zwei großen Doppelschleifen als Untereinheiten bestehen (Abb.1). Die Doppelschleifen sind durch kurze Sequenzen verbunden, und die Auffaltung zu Doppelschleifen erfolgt durch je zwei benachbarte Cystinbrücken. Die Aminosäuren bilden zu 75% α -Helices mit Biegungen nahe den Mittelpunkten der Disulfidschleifen und, wenn überhaupt, nur wenig β -Konformation (McLACHLAN und WALKER, 1978).

Aufgrund von Analogien in der Primärstruktur innerhalb von Albumin wie auch zwischen einer einzelnen Albuminschleife und Teilen von α -Hämoglobin oder Myoglobin schließt BROWN (1976) auf folgende Schritte in der Evolution zum heute vorliegenden Albumin:

Der Bauplan für eine Doppelschleife entstand durch Duplikation eines Gens, das als Vorläufer einer großen Schleife sowie von Segmenten eines primitiven Globins anzusehen ist. Eine Gentrifikation mit anschließender Deletion für die mittlere Doppelschleife führte von der Untereinheit zur

Einheit und eine Genduplikation mit nachfolgender Halbduplikation zum heutigen Albumin.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Transportfunktion von Albumin, deren physiologische Bedeutung jedoch im Gegensatz zu anderen Serumproteinen wie Transcortin, Thyroxinbindendes Globulin, Haptoglobin, Hämoexin, Transcobalamin II oder Transferrin mit ihren jeweils spezifischen Liganden Kortisol, Thyroxin und Trijodthyronin, Hämoglobin, Häm, Vitamin B₁₂ bzw. Eisen(MARKI, 1979) sich auf weit mehr Substanzgruppen erstreckt. Neben der reversiblen Bindung endogener Substanzen, zum Beispiel unveresterter Fettsäuren, Bilirubin, L-Thyroxin, L-Tryptophan, Estradiol, Progesteron, Kortisol, Testosteron und Prostaglandinen(PETERS, 1975), ist besonders die Bindung von Drogen an Albumin einerseits Objekt pharmakokinetischer Forschung bei Einführung einer neuen Wirksubstanz, andererseits Mittel zur Beschreibung der Albuminstruktur.

Die Bedeutung der Albuminbindung für die Pharmakokinetik einer Droge ergibt sich aus folgenden drei Faktoren: Der gebundene Anteil erreicht nicht den Wirkort und ist daher pharmakologisch unwirksam, er ist der metabolischen Inaktivierung durch die intrazellulär gelegenen Enzymketten entzogen und kann auch renal nicht eliminiert werden, da Albumin für eine glomeruläre Filtration zu groß ist. Daher resultiert aus der Albuminbindung, neben der Bindung an Blut- und Gewebezellen (insbesondere Fettzellen), eine Depotwirkung für das applizierte Pharmakon (nach KURZ et al, 1977).

Aus diesen Erläuterungen lassen sich unschwer die Auswirkungen einer herabgesetzten Albuminbindung endogener oder exogener Substanzen ableiten, die oft Folge von Urämie, Hypoalbuminämie, Hyperbilirubinämie, Leberdysfunktion (VALLNER, 1977) oder Applikation eines zweiten Medikamentes ist.

So führt die Verordnung von Phenylbutazone an Patienten, die langfristig mit oralen Antikoagulantien behandelt werden, zu

einer deutlichen Verstärkung der Hypothrombinämie und kann ernste Blutungen hervorrufen. Dieser Effekt wird zurückgeführt auf einen Anstieg der Konzentration des ungebundenen Anteils der blutgerinnungshemmenden Substanz, der die Folge einer kompetitiven Verdrängung durch Phenylbutazone an derselben Bindungsstelle im Albumin ist (O'REILLY, 1973). Sulfonamide sind in der Pädiatrie prä- und postnatal kontraindiziert, da sie unkonjugiertes Bilirubin aus der Albuminbindung verdrängen und so die Auswirkungen des vor allem durch Unreife der hepatischen Glukuronyltransferase hervorgerufenen physiologischen Icterus neonatorum verschlimmern können bis hin zum Kernicterus mit irreversiblen neurologischen Ausfällen (FISCHER, 1980).

Bei Erkrankungen sind die Bindungskonstanten einiger Drogen oft in unterschiedlichem Umfang verändert (KOBBER et al, 1978 sowie MÜLLER und WOLLERT, 1979), und viele Pharmaka, deren Affinität zu Albumin bekannt ist, verdrängen sich nicht gegenseitig (SJÖHOLM et al, 1979), wie es bei nur einer Bindungsstelle zu erwarten wäre. Um diese Phänomene zu erklären und vor allem weitere Interaktionen vorherzusagen, wird an der Aufklärung der Mechanismen und Albuminstrukturen gearbeitet, die zur Bindung von Liganden führen. Mit den Aufsätzen von MEANS et al.(1982) und insbesondere FEHSKE et al.(1981) als Leitlinie ergibt sich bisher folgendes Bild:

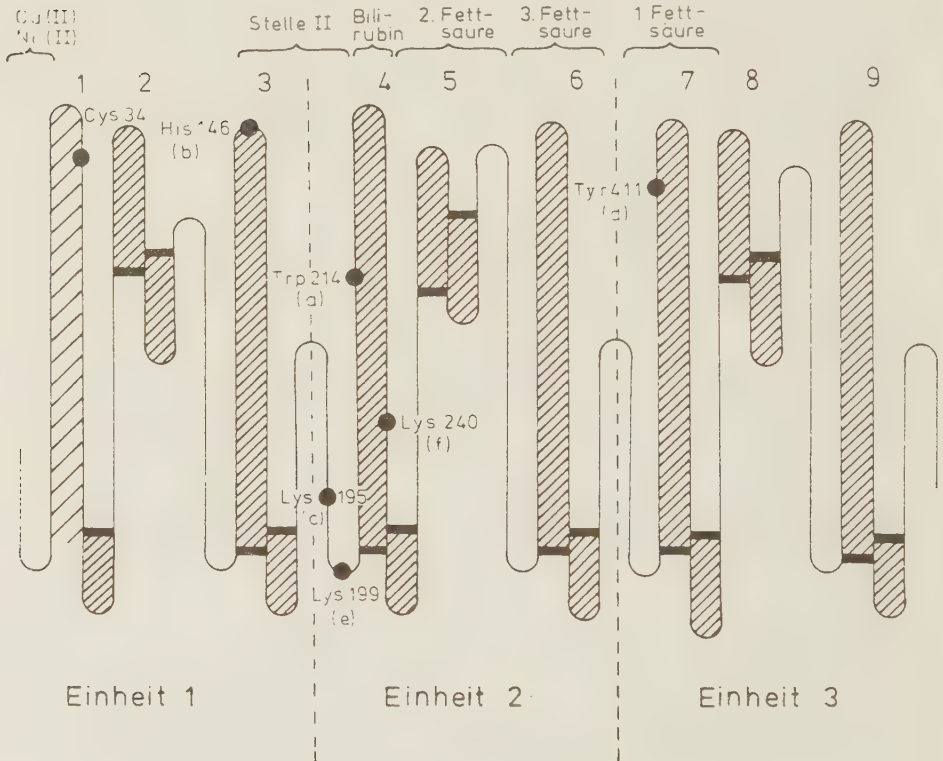
Durch Messungen, die Unabhängigkeit von Bindungen unterschiedlicher Substanzen an HSA nachwiesen, konnte auf die Existenz von acht verschiedenen für ihre jeweiligen Liganden spezifischen Bindungsstellen geschlossen werden, die zumeist nach typischen Vertretern ihrer Liganden benannt sind.

Abb.1 zeigt Ergebnisse für die Lokalisierung dieser Stellen in der HSA-Primärstruktur. Die in der Abbildung eingezeichneten Indices werden im folgenden Text erläutert.

1) Warfarinstelle oder Stelle I (nach SUDLOW et al., 1976). FEHSKE et al.(1979b) modifizierten Trp 214 (a) und schlossen aus einer deutlichen Affinitätserniedrigung von Stelle I -

spezifischen Liganden auf eine Beteiligung dieser Aminosäure an der Warfarinstelle. Das Gebiet dieser Bindungsstelle ist nach ihrer Arbeit deutlich getrennt von der Indol- und Benzodiazepinstelle.

Abb.1 Schematische Darstellung der HSA-Struktur und Lokalisation einiger Bindungsstellen



Struktur nach BROWN (1976), Nummerierung der Aminosäuren nach MELOUN et al. (1975). Die durch Disulfidbrücken (—) aufgefalteten Schleifen sind eng schraffiert dargestellt, während der grob schraffierten ersten Schleife die Disulfidbrücke fehlt. Die gestrichelten Linien illustrieren die Aufteilung in drei Einheiten. Cys 34 enthält die einzige freie Thiolgruppe. Die anderen eingezeichneten Aminosäuren können spezifisch

modifiziert oder markiert werden. Die daraus ableitbaren Folgerungen für Ligandenbindung am HSA ist den Indices folgend im Text dargestellt, wie auch die Literaturangaben für die Zuordnung der aufgeführten Bindungsstellen zur Primärstruktur.

2) Indol- und Benzodiazepinstelle oder Stelle II (nach SUDLOW et al., 1976)

Nach eigenen Ergebnissen und denen anderer Autoren sind FEHSKE et al. (1979b) der Überzeugung, daß die Aminosäuresequenz 145-150 in Doppelschleife 3 den Hauptteil der Stelle II bildet. Durch spezifische Veränderung von His 146 (b) oder Lys 195 (c) konnte diese Stelle geblockt werden (GAMBHIER et al., 1975). Da Tyr 411 (d) ebenfalls an dieser Stelle beteiligt ist (MEANS et al., 1982), bildet offensichtlich nicht ein einziger Sequenzausschnitt aus der Primärstruktur die Benzodiazepinstelle, sondern sie wird erst durch Faltungen in der Tertiärstruktur vervollständigt.

FEHSKE et al. (1981) betrachten in ihrem Übersichtsartikel Lys 199 (e) als Teil der Warfarinstelle oder zumindest ihr eng benachbart. Eigene Ergebnisse bestätigen diese Zuordnung nicht, und die Arbeiten anderer Autoren, wie im Kapitel 5.1.3.2 ausführlich diskutiert, läßt mich vielmehr auf die Zugehörigkeit von Lys 199 zur Stelle II schließen. In diesem Zusammenhang werden unter 5.1.3.2 auch die Quellen angegeben, nach denen mittelkettige Fettsäuren ebenfalls an der Benzodiazepinstelle binden.

3) Die Digitoxinstelle

ist nach SJÖHOLM et al. (1979) unabhängig von den beiden vorangehenden.

4) Die primäre Bilirubinstelle

wird von Teilen der Sequenz 186-238 im Rinder Serumalbumin gebildet (REED et al., 1975) und enthält somit die Doppelschleife 4. In Übereinstimmung hierzu stellt JACOBSEN (1978) die Zugehörigkeit von Lys 240 (f) im HSA zur hochaffinen Bilirubinstelle fest, während Trp 214 (a) nicht beteiligt ist (JACOBSEN, 1972).

5) Cu(II) und Ni(II)

werden von einem Peptid, das die Aminosäuren 1-24 enthält, genauso fest gebunden wie vom vollständigen Albumin (PETERS,

1977). FEHSKE et al.(1981) zitieren eine Arbeit, nach der diese Stelle schon erfolgreich synthetisiert werden konnte. Für die

6) primäre Bindungsstelle langkettiger Fettsäuren geben REED et al.(1975) sowie LEE und McMENAMY (1980) zwei Sequenzen an, die beide die Doppelschleife 7 (Aminosäuren 377-446) enthalten. Diese Lokalisation bestätigt PETERS (1977).

7) Eine sekundäre Bindungsstelle für langkettige Fettsäuren vermuten REED et al.(1975) im BSA in der Nähe von Doppelschleife 5 (Aminosäuren 239-306) und eine

8) tertiäre Bindungsstelle für langkettige Fettsäuren in der Nähe von Doppelschleife 6 (Aminosäuren 307-377).

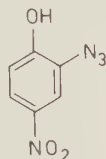
Dieses Konzept darf nicht dahingehend mißverstanden werden, daß eine Substanz, die zumeist durch kompetitive Verdrängung eines Leit-Liganden einer dieser Stellen zugeordnet werden konnte, an keiner anderen noch binden könnte. Vielmehr existieren am Albumin für fast alle Liganden neben der primären noch weitere Bindungsstellen, deren Affinitätskonstanten sich jedoch zur primären um meist eine oder zwei Größenordnungen unterscheiden. So bindet Phenylbutazone primär an Stelle I (ausführlich in Kapitel 5.1.3.1 diskutiert) und mit weitaus schwächerer Affinität an Stelle II (MEANS et al, 1982), die sekundäre Bilirubinstelle ist identisch mit Stelle II (SOLTYS und HSIA, 1978), und für Indomethacin ist die primäre Bindungsstelle die Stelle I, die tertiäre die Stelle II und die sekundäre ist noch nicht lokalisiert (EKMAN et al.,1980).

Will man die Auswirkungen der Interaktionen zwischen mehreren Liganden und HSA auf deren freie Konzentrationen vorhersagen, so erscheint eine systematische Zuordnung zu definierten Bindungsstellen am HSA mit Angabe der Assoziationskonstanten zumindest für die jeweiligen primären und sekundären Bindungsstellen unumgänglich. Jedoch wird eine Vorhersage anhand dieses Modells kompliziert durch allosterische Wechselwirkungen der Stellen untereinander. So löst sich Diazepam bei der Bindung von Ölsäure an die primäre

Stelle für langkettige Fettsäuren von der Benzodiazepin-stelle (SJÖDIN, 1977 sowie WONG und SELLERS, 1979), während bei Bindung von Palmitinsäure an die primäre Fettsäurestelle die Affinität der Benzodiazepinstelle für Diazepam zunimmt (WONG und SELLERS, 1979).

2-Azido-4-nitrophenol (NPA) (Abb.2), ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, wurde in unserem Labor synthetisiert (Molekulargewicht 180,13; pK_a $5,62 \pm 0,05$; HANSTEIN et al., 1979).

Abb.2 2-Azido-4-nitrophenol (NPA)



NPA bindet, wie in dieser Arbeit gezeigt wird, mit hoher Affinität an eine Ligandenstelle am HSA. Weitere Bindungsstellen für NPA müssen, wenn überhaupt vorhanden, deutlich niedrigere Affinitäten aufweisen, so daß NPA als geeignetes Hilfsmittel zur Beschreibung einer der Bindungsstellen am HSA erscheint.

Ziel dieser Arbeit ist es, diese Bindungsstelle näher zu charakterisieren.

Hierfür bietet NPA zwei Möglichkeiten: Einerseits ist NPA geeignet zur Photoaffinitätsmarkierung (HANSTEIN et al., 1979), andererseits ist NPA in Abwesenheit von intensivem Licht stabil und kann für photometrische Studien von Gleichgewichtsbindungen dienen (HANSTEIN, 1979).

2 ABKÜRZUNGEN

BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
HSA	menschliches Serumalbumin (human serum albumin)
NPA	2-Azido-4-nitrophenol
NPS	o-Nitrophenylsulfenylchlorid
r	Korrelationskoeffizient

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

Zur Proteinbestimmung wurde ein Spectrophotometer von Hitachi (Modell 101) benutzt. Alle anderen Extinktionsmessungen wurden mit einem Shimadzu double-beam/difference/dual-wavelength recording spectrophotometer UV 300 durchgeführt, an das ein Shimadzu spectral data processor sapcom-1 angeschlossen war.

Zur Berechnung von Regressionsgeraden und den in Kapitel 4 gezeigten Auftragungen wurden Programme geschrieben für einen HP 41 CV mit peripherem Drucker 82143A und Magnetkartenleser 82104A von Hewlett Packard.

Für die Erstellung der Densitogramme diente ein Zeiss ZK 4 mit Monochromator M4Q III, Extinktionsanzeiger PMQ II und Potentiometerschreiber mit Integrator Metrawatt RE 542.

Radioaktive Proben wurden in Kunststofffläschchen (Zinsser) von einem gekühlten Flüssigkeitszintillationspektrometer Packard Tricarb Modell 3003 gezählt.

Als Tischzentrifuge fand Verwendung ein Mikro-Hämatokrit, Heraeus Christ GmbH Osterode/Harz.

3.2 Chemikalien

Bayer: Naphthalin

Calbiochem, San Diego, Calif.: Ouabain

Merck: Natriumsalicylat (krist.); Acetylsalicylsäure;

Barbital (5,5-Diäthylbarbitursäure Natriumsalz);

Phenobarbital-Na (Luminal^R-Na); Cystin; 2,5-Diphenyl-oxazol

New England Nuclear: Protosol

Packard: tritiiertes Wasser ($2,55 \times 10^6$ dpm/g am 8. Jan. 76)

Pentex: HSA (fatty acid free, fraction V, Miles Laboratories, Inc.)

Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex G-25

Serva: alle Chemikalien für Weber-Osborn Gele; BSA (essentially fatty acid-free, prepared from fraction V albumin); Coomassie Brilliant Blue R250 ; β -Mercapto- α -ethanol; Dextran Blau

Sigma: 4-Hydroxycumarin; Cloxacillin (Sodium Salt, Potency 905 mg/g); Methicillin (Sodium Salt, Potency 890mg/g); Dicloxacillin (Sodium Salt, Potency 910 mg/g); Oxacillin (Sodium Salt, Potency 890 mg/g); Indomethacin; Phenylbutazone; Sulfamethoxypyridazine; Sulfisomidine; Sulfisoxazole; o-Nitrophenylsulfenylchlorid; Pepsin (from hog stomach mucosa, 2mal kristallisiertes und lyophilisiertes Pulver)

Thiopental-Natrium (Trapanal^R) war ein Geschenk von Byk Gulden Konstanz, Hexobarbital (Evipan^R) von Bayer Leverkusen.

Alle Chemikalien wurden in höchstmöglicher Reinheit erworben.

NPA und ³H-NPA (16 mCi/mmol) wurde in diesem Labor hergestellt.

3.3 Methoden

3.3.1 Bestimmung der Assoziationskonstanten für die Bindung von NPA an HSA

Die Konzentration der NPA-Stammlösung (in Aq. dest. gelöstes NPA) wurde photometrisch bestimmt (HANSTEIN, 1979). In eine 4 ml fassende Glasküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm wurde 3ml NPA (10,3 μ M), gelöst in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4), pipettiert. Die Temperatur des Küvettenhalters wurde durch ein Wasserbad reguliert. Von Meßpunkt zu Meßpunkt wurde anfangs 5 μ l HSA (0,38 μ M) zugefügt, bei Erreichen des Extinktions-Plateaus (Abb.5) 20 bis 50 μ l. Gemessen wurde mit der

dual-wavelength Methode die Differenz zwischen den Extinktionen bei 450 nm und 500 nm, die ein Maß darstellt für die Bindung von NPA an HSA, wie in Kapitel 4.1.2 genauer erläutert wird.

3.3.2 Verdrängung des NPA vom HSA

In eine 4 ml fassende Glasküvette (Schichtdicke 1 cm) wurde 3 ml eines Ansatzes von NPA(10 μ M) und HSA(2,3 μ M) pipettiert. War die auf Inhibierung der NPA-Bindung am HSA zu untersuchende Substanz in ausreichend hoher Konzentration in 50 mM Natriumphosphatpuffer löslich, so wurde der Puffer dieser Stammlösung auch für den oben erwähnten Ansatz verwendet. War die Löslichkeit der Substanz in diesem Puffer zu gering, wurde statt dessen für die Stammlösung verdünnte Natronlauge genommen. Um die pH-Veränderung durch Einbringen dieser alkalischen Stammlösung in die Küvette während der Meßreihe gering zu halten, wurde in diesen Fällen der anfangs erwähnte Ansatz mit 200 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) erstellt.

Die Temperatur des Küvettenhalters wurde durch ein Wasserbad auf 37 °C reguliert. Nur bei den Salicylaten wurde die Verdrängung auch bei 20 °C gemessen.

Um deutlich registrierbare Extinktionsänderungen zu erzielen, die hier ein Maß sind für die NPA-Verdrängung (ausführlich in Kapitel 4.2.1 dargestellt), müssen für die letzten Meßpunkte einer Reihe um 1 bis 2 Zehnerpotenzen größere Substanzmengen als für die ersten zugefügt werden. Daher wurden aus den Stammlösungen um jeweils den Faktor 4 verdünnte Lösungen hergestellt.

3.3.3 Modifizierung von HSA

3.3.3.1 HSA-Modifizierung durch NPS

In Anlehnung an JACOBSEN (1972) und BOCCU et al.(1970) wurde

65 mg NPS in 1 ml Eisessig gelöst. Hiervon wurde 250 μ l unter Rühren zu HSA(250 mg) in 7,5 ml einer 20 %igen wässrigen Essigsäure gegeben. Die Reaktionszeit betrug 5 Stunden bei 0 °C.

Eine leichte Trübung, die durch in der schwächeren Säure ausgefallenes NPS oder auch denaturiertes HSA entstanden sein mag, konnte durch Zentrifugieren über 5 Minuten in der Tischzentrifuge abgetrennt werden. Der Überstand wurde sofort gegen 700 ml 20 %iger Essigsäure 4,5 Stunden lang bei 0 °C und anschließen viermal für jeweils 10 Stunden bei Zimmertemperatur gegen 2,5 l Natriumphosphatpuffer (50 mM; pH 7,4) dialysiert, um nicht reagiertes NPS beziehungsweise dessen Zerfallsprodukte aus einer möglichen Bindung an HSA zu entfernen. Die Konzentration von NPS-HSA wurde mit der Methode zur Proteinbestimmung nach Biuret gemessen.

3.3.3.2 HSA-Modifikation_durch_Acetylsalicylsäure

Je 4 ml $2,0 \times 10^{-4}$ M HSA und $1,0 \times 10^{-3}$ M Acetylsalicylsäure, beide gelöst in 0,1 M Natriumphosphatpuffer(pH 7,4), wurden zusammengegeben und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert (HAWKINS et al., 1969 sowie WALKER, 1976).

Nach Volumeneinengung auf 1,8 ml durch Filtration in einem Dialyseschlauch gegen Unterdruck wurde bei Zimmertemperatur 9 Stunden lang gegen 300 ml Natriumphosphatpuffer (50 mM; pH 7,4) dialysiert und anschließend zweimal für 16 Stunden gegen jeweils 1,5 l Puffer, um gebundene Acetylsalicylsäure oder durch Hydrolyse entstandene Salicylsäure vom HSA zu trennen.

Angenommen, vor der Dialyse sei an der untersuchten Stelle pro mol HSA ein mol Salicylsäure gebunden, die, wie in Kapitel 4.2.5 gezeigt, eine deutlich höhere Affinität zu dieser Stelle besitzt als Acetylsalicylsäure, so wäre nach der letzten Dialyse noch 0,6 % der Stelle am HSA besetzt, wenn dieser Berechnung die in 4.2.5 ermittelte Assoziationskonstante zugrunde gelegt wird.

Die HSA-Konzentration wurde durch die Proteinbestimmung

nach Biuret kontrolliert.

3.3.4 Pepsin-Spaltung von mit ^3H -NPA markiertem BSA und deren Auswertung

3.3.4.1 Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode

Für die Biuret-Methode mit Desoxycholat nach GORNALL et al. (1949) wurde eine Biuretlösung folgendermaßen angesetzt:

1,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
6,0 g $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$
in 500 ml Aq. dest.
+ 300 ml NaOH(10 %)
ad 1 l Aq. dest.

Zu 1,45 ml Biuretlösung wurde 1,47 ml Aq. dest. und 0,05 ml Proteinprobe gegeben, falls die erwartete Proteinkonzentration zwischen 20 und 50 mg/ml lag. Ansonsten wurde im Ausgleich mit der Menge an Aq. dest. das Volumen der Proteinprobe variiert. Für den Nullwert wurde statt der Proteinprobe der entsprechende Puffer pipettiert. Nach Zugabe von 0,03 ml Desoxycholat(10 %) wurden die Ansätze im Wasserbad für 40 Sekunden auf 100 °C erhitzt. Nach deren Abkühlung wurde bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ die Extinktionsmessung vorgenommen, aus der sich mit Hilfe einer mit BSA ermittelten Eichgeraden die gesuchte Konzentration ergab.

3.3.4.2 Synthese_von_half-cystinyl_BSA

Der Beschreibung von KING und SPENCER (1970) folgend, wurde 1,01 g BSA in 32,5 ml Tris-HCl Puffer(0,1 M Tris; mit 1 n HCl auf pH 7,96 eingestellt) gelöst. Ferner wurde 21,8 mg L-Cystin in 0,49 ml 1,08 n NaOH aufgelöst und sofort 45,4 ml des Tris-HCl Puffers hinzugefügt. Die beiden Ansätze wurden zusammengegeben und 17 Stunden lang gerührt.

Nach einer Volumeneinengung auf 10,8 ml durch Filtration in

einem Dialyseschlauch gegen Unterdruck wurde der Proteingehalt mit der Biuret-Methode überprüft.

3.3.4.3 BSA-Markierung mit ^3H -NPA

Zu 10,6 ml halb-cystinyl BSA(65,5 mg/ml) wurde 0,54 ml ^3H -NPA(6,8 mM) gegeben. Nach HANSTEIN (1979) kann noch sichtbares Licht von 600 bis 700 nm Nitrene erzeugen, die einen notwendigen Zwischenschritt bei der kovalenten Bindung von NPA darstellen. Deshalb wurde der Ansatz aus ca. 20 cm Abstand von einer 1000 W Jodlampe 1 Stunde lang bestrahlt. Der Ansatz war dabei von einem als Lichtfilter dienenden Kupfersulfatbad(5 %) umgeben, in dem durch eine Kühlschlange eine Aufheizung über 21 °C vermieden wurde.

3.3.4.4 BSA-Spaltung durch Pepsin

Bei pH-Erniedrigung auf pH 3,7 ändert sich die BSA-Konformation in der Weise, daß eine Trennung der Schleifen 1 bis 5 von den Schleifen 6 bis 9 durch Streckung der verbindenden Aminosäuren 288 bis 313 eintritt. Auf diese Weise erhält Pepsin Zugang zu diesem Verbindungsstück und spaltet BSA zwischen den Aminosäuren 306 und 307 (REED et al., 1975 sowie KING, 1973).

Die höchste Ausbeute der beiden Stücke wird unter Zugabe von Oktansäure erzielt, die eine kompaktere BSA-Konformation stabilisiert und so die Verdaubarkeit reduziert. In der Abwesenheit von Oktansäure und/oder pH-Werten niedriger als pH 3,7 werden sonst beide Fragmente rasch weiter gespalten (KING, 1973).

Daher lauten die auf FELDHOFF und PETERS (1975b) sowie auf KING (1973) zurückgehenden Verhältnisse bei einer typischen Spaltung mit Pepsin:

Eine 2,5 %ige Lösung von BSA wurde erstellt, indem 195 mg markiertes BSA in 7,8 ml Ammoniumformiatpuffer(0,12 M; pH 3,7; 3,2 mM Oktansäure) überführt wurde. Zugefügt wurde 0,39 ml

eines Ansatzes, in dem 2 mg Pepsin in 4 ml HCl(1 mM) gelöst vorlag. Die Reaktion wurde in einem Wasserbad bei 25 °C unter stetem Rühren durchgeführt und nach 20 Minuten gestoppt, indem das Pepsin durch Zugabe von 2 M Tris bis pH 8,2±0,2 denaturiert wurde.

Um eine denkbare Ablösung des kovalent gebundenen NPA von den Bruchstücken zu mindern, wurde sofort nach der Spaltung β -Mercaptoäthanol als Oxidationsschutz (nach HANSTEIN et al., 1979) bis zu einer Konzentration von 1 % in das Reaktionsgemisch eingebracht.

3.3.4.5 Gelelektrophorese

Nach WEBER und OSBORN (1969) wurden 13 runde 12,5 %ige Acrylamidgele (Länge 10 cm; Durchmesser 0,6 cm) folgendermaßen gegossen:

Zu 22,4 ml einer wässrigen Acrylamid(22,2 %)-N,N-Methylenbisacrylamid(0,6%)-Lösung wurde 15,6 ml W/O Puffer(38,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$; 2,0 g Natriumdodecylsulfat; ad 1 l Aq. dest.) gegeben und 10 Minuten lang entgast. Nach Einrühren einer Lösung aus 2 ml Ammoniumpersulfat(10 mg in 2 ml Aq. dest.) und 40 μl N,N,N',N'-Tetramethyläthylen-diamin wurden sofort die Gele gegossen und mit Wasser überschichtet.

Nach Beendigung der Polymerisation wurde das Wasser abgesaugt und pro erwarteter Proteinbande 5 bis 10 μg Protein auf ein Gel aufgetragen. Dieses Protein befand sich in 50 μl einer Lösung, die neben dem zu trennenden Protein zu 25 % aus einem Probenpuffer bestand (9,5 % Natriumdodecylsulfat; 9,5 Vol.% β -Mercaptoäthanol; ad 100 ml W/O Puffer) und mit Aq. dest. aufgefüllt wurde. Diese Lösung wurde vor dem Auftragen für eine Minute in ein kochendes Wasserbad gebracht. Es wurde ein Tropfen Glycerin und als Referenz 5 μl Bromphenolblau(0,5 %) zugefügt und nach Mischen dieser drei Komponenten mit durch Aq. dest. 1:1 verdünnten W/O Puffer überschichtet, mit dem auch die beiden Kammern gefüllt wurden. Die Spannung wurde so geregelt, daß pro Gel 3 bis 4

mA floß. Die Laufzeit betrug etwa 16 Stunden.

Zur Erstellung eines Densitogrammes wurde die Bromphenolblaubande mit einer Kunststoffborste markiert. Die Gele wurden für 5 bis 6 Stunden in eine Färbelösung A (350 mg Coomassie Brilliant Blue R 250 ; 250 ml Isopropanol; 100 ml Essigsäure; ad 1 l Aq. dest.) und dann über Nacht in eine Färbelösung B (35 mg Coomassie Brilliant Blue R 250 ; 100 ml Isopropanol; 100 ml Essigsäure; ad 1 l Aq. dest.) gebracht. Nach Behandlung mit einem Entfärber (75 ml Essigsäure; 50 ml Methanol; ad 1 l Aq. dest.) wurden sie in 7 %iger Essigsäure aufbewahrt.

Zur Erstellung eines Radioaktivitätsprofiles wurden zumeist 10 Gele mit einem Gelschneider in Scheibchen von 1,2 mm Dicke zerschnitten. Die Gelscheibchen gleicher Position wurden in Kunststofffläschchen gesammelt und 24 Stunden lang bei 40 °C mit einer Protosollösung (500 ml Protosol 0,5 M; 450 ml Toluol; 50 ml Methanol) verdaut. 10 ml Dioxan-Cocktail (100 g Naphthalin; 5 g 2,5-Diphenyloxazol; ad 1 l Dioxan) und 100 µl Eisessig wurden pro Fläschchen zugegeben. Mit der Zählung, die pro Fläschen 10 Minuten dauerte, wurde bis zum Abklingen der Chemoluminiszenz gewartet.

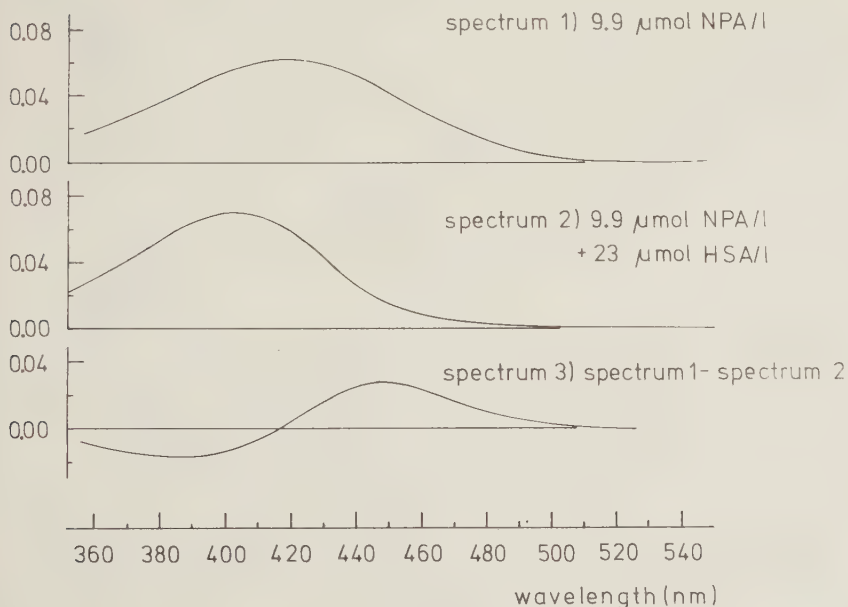
4 ERGEBNISSE

4.1 Bindung von NPA an HSA

4.1.1 Titration der Bindung

Wie Abb.3 zeigt, verschiebt sich das NPA-Spektrum bei Bindung an HSA zu kürzeren Wellenlängen hin. Auch in der Bindung an HSA liegt NPA bei pH 7,4 als Anion vor, da NPA in neutraler Form in diesem Spektralbereich kein Absorptionsmaximum aufweist (HANSTEIN et al., 1979).

Abb.3 Verschiebung des NPA-Spektrums bei Bindung von NPA an HSA



50 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7,4; 37 °C. In der Ordinate ist die Extinktion aufgetragen.

Aus dem Differenzspektrum folgt, daß der Extinktionsunterschied zwischen freiem und gebundenem NPA bei ungefähr 450 nm am größten ist, während die Wellenlänge 500 nm in der Nähe des isobestischen Punktes liegt. Extinktionen maß ich in dieser Arbeit immer, falls nicht ausdrücklich anders erwähnt, mit der dual-wavelength Methode daher bei den Wellenlängen 450 nm und 500 nm, wie auch schon HANSTEIN et al. (1979) bei der Bindung des NPA an BSA:

$$E = E_{450} - E_{500} \quad (1)$$

Es sei NPA_f die molare Konzentration des freien und NPA_b die des gebundenen NPA, $\epsilon_{f,i}$ der molare Extinktionskoeffizient für freies NPA bei der Wellenlänge i nm, $\epsilon_{b,i}$ der des gebundenen, $\Delta\epsilon = \epsilon_{450} - \epsilon_{500}$ und d die Schichtdicke. Dann gilt nach Gleichung 1:

$$\begin{aligned} E &= \{ (NPA_f \epsilon_{f,450} + NPA_b \epsilon_{b,450}) - (NPA_f \epsilon_{f,500} + NPA_b \epsilon_{b,500}) \} d \\ E &= \{ NPA_f (\epsilon_{f,450} - \epsilon_{f,500}) + NPA_b (\epsilon_{b,450} - \epsilon_{b,500}) \} d \\ E &= \{ NPA_f \Delta\epsilon_f + NPA_b \Delta\epsilon_b \} d \end{aligned} \quad (2)$$

Solange das molare Verhältnis NPA zu HSA kleiner als 1 ist, absorbiert NPA deutlich schwächer als ungebundenes NPA, während bei NPA-Überschuß die Extinktionskoeffizienten fast gleich sind (Abb.4).

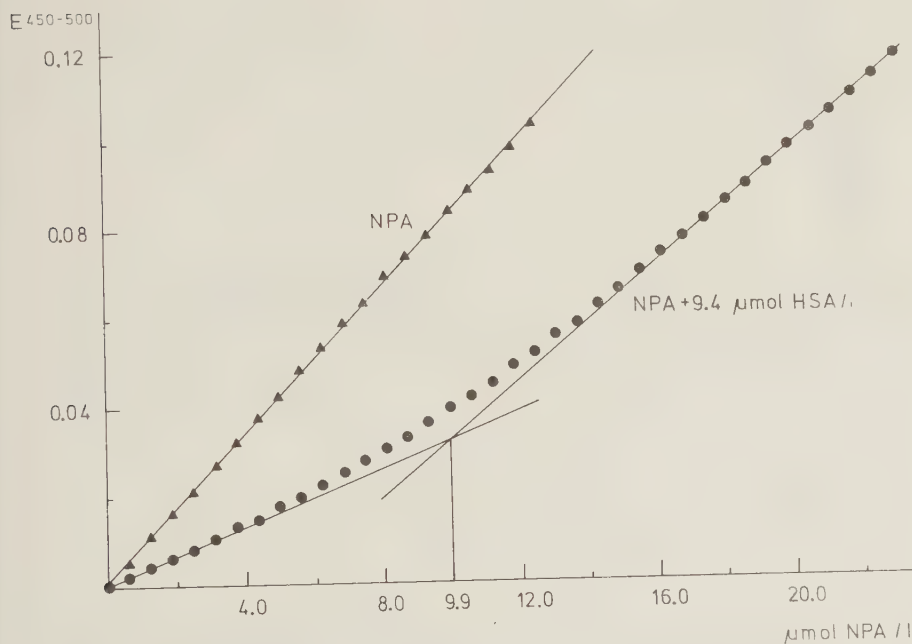
Die Lage des Schnittpunktes der Regressionsgeraden für die Extinktion in Anwesenheit von HSA läßt folgende Schlüsse zu:

- a) Das molare Verhältnis der photometrisch zu beobachtenden Bindung von NPA an HSA ist 1:1. Zum gleichen Ergebnis kamen HANSTEIN et al. (1979) für die NPA-Bindung an BSA.
- b) Es wird die Bindungsstelle mit der deutlich höchsten Affinität für NPA untersucht, da im Falle anderer, photometrisch nicht zu beobachtenden Bindungsstellen höherer oder gleicher Affinität der Schnittpunkt der Regressionsgeraden zu höheren NPA-Konzentrationen entsprechend $NPA:HSA > 1$ verschoben wäre.

Daß die Extinktionskoeffizienten des freien NPA und des NPA bei molarem Überschuß gegenüber HSA unterschiedlich sind

(d.h. die zugehörigen Regressionsgeraden nicht parallel sind; Abb.4), mag vielleicht auf weitere NPA-Bindungsstellen am HSA zurückzuführen sein. Diese Abweichung ist jedoch verglichen mit dem Einfluß der primären Stelle auf die NPA-Extinktion so gering, daß sie im Folgenden vernachlässigt wird.

Abb.4 Titration der photometrisch zu beobachtenden Bindung von NPA an HSA

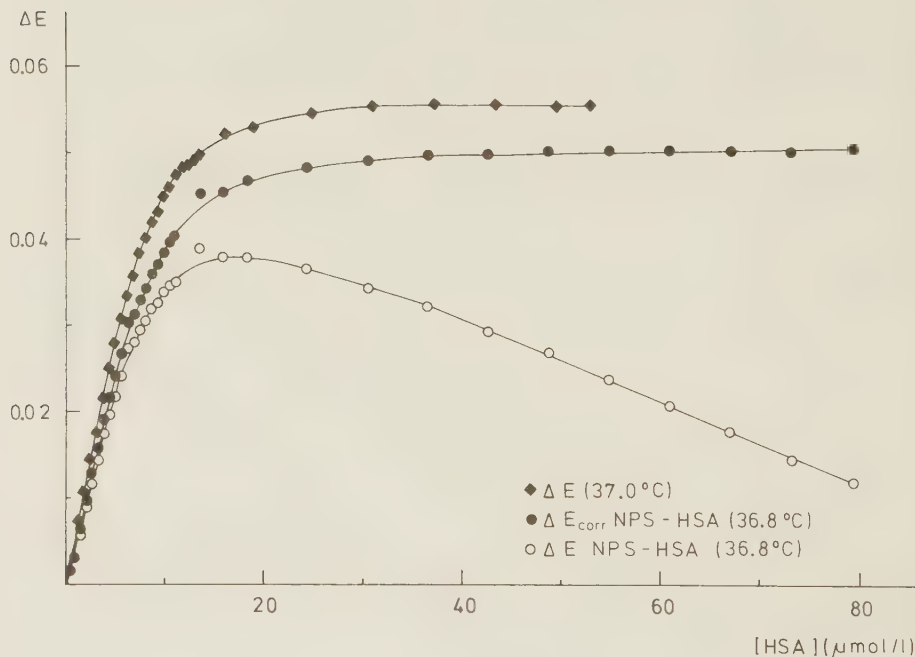


50 mM Natriumphosphatpuffer ; pH 7,4 ; 37 °C

4.1.2 Meßverfahren zur Bestimmung der Assoziationskonstanten

Bei durch ein Wasserbad regulierter Temperatur wurde zu einer vorgegebenen Menge NPA schrittweise HSA zugefügt. Es sei NPA_t die totale molare NPA-Konzentration und $\Delta\epsilon' = \Delta\epsilon_f - \Delta\epsilon_b$.

Abb.5 Bindung von NPA an HSA sowie an durch NPS an der Stelle Trp 214 modifiziertem HSA



ΔE_{corr} NPS-HSA sind die um die Eigenabsorption des NPS-HSA korrigierten Meßwerte. 50 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7,4; 10,3 μM NPA

Dann gilt für die nach Abb.3 und 4 bei einer dual-wave-length Messung bei 450 nm und 500 nm zu erwartenden Extinktionsabnahme ΔE :

$$\Delta E = E_{\text{ohne HSA}} - E_{\text{mit HSA}} \quad (3)$$

$$\Delta E = \{ \text{NPA}_t \Delta \epsilon_f - (\text{NPA}_f \Delta \epsilon_f + \text{NPA}_b \Delta \epsilon_b) \} d \quad (\text{nach Gl. 2})$$

$$\Delta E = \{ \text{NPA}_b \Delta \epsilon_f - \text{NPA}_b \Delta \epsilon_b \} d \quad (4)$$

$$\Delta E = \{ \text{NPA}_b (\Delta \epsilon_f - \Delta \epsilon_b) \} d$$

$$\Delta E = \text{NPA}_b \Delta \epsilon' d \quad (5)$$

ΔE ist somit ein Maß für das nach Zugabe von HSA an der beobachteten Stelle gebundene NPA (siehe in Abb.5 die Kurve

für die NPA-Bindung an HSA bei 37,0 °C).

Da in der Meßreihe dem Ansatz schrittweise HSA zugefügt wird, ist der Unterschied zwischen NPA_t der ersten Messung und NPA_f den n-ten Messung nicht nur auf gebundenes NPA zurückzuführen, wie in dem Schritt zur Gleichung 4 vorausgesetzt, sondern auch auf die inzwischen erfolgte Verdünnung der NPA-Konzentration. Um diesen Fehler zu korrigieren, wurde $E_{mit\ HSA}$, das beim Volumen V_n gemessen wurde, auf das zu erwartende $E_{mit\ HSA}$ bei dem Volumen V_o der ersten Messung der Meßreihe umgerechnet, so daß von nun an, wenn von ΔE die Rede ist, nicht das ΔE der Gleichung 3 sondern das der folgenden gemeint ist:

$$\Delta E = E_{ohne\ HSA} - (E_{mit\ HSA} \times \frac{V_n}{V_o}) \quad (6)$$

HSA_f sei die molare Konzentration des freien HSA, HSA_t die des totalen HSA, beide bezogen auf V_1 , und NPA'_b das Verhältnis zwischen der gebundenen und der totalen NPA-Konzentration. Für die zu bestimmende Dissoziationskonstante des Komplexes NPA-HSA gilt:

$$\frac{NPA_f \cdot HSA_f}{NPA_b} = K_D$$

$$\frac{(NPA_t - NPA_b) (HSA_t - NPA_b)}{NPA_b} = K_D$$

$$\frac{NPA_t^2}{NPA_b} (1 - \frac{NPA_b}{NPA_t}) (\frac{HSA_t}{NPA_t} - \frac{NPA_b}{NPA_t}) = K_D$$

$$NPA_t (1 - NPA'_b) (\frac{HSA_t}{NPA_t} - NPA'_b) = K_D \cdot NPA'_b \quad (7)$$

Zur Vereinfachung wird der linke Term α genannt:

$$\alpha = K_D \cdot NPA'_b \quad (8)$$

Wird α gegenüber NPA'_b aufgetragen, so ist nach dieser Beziehung die gesuchte Assoziationskonstante K_A gleich dem Kehrwert der Steigung der Regressionsgeraden ($= K_D$).

4.1.2.1 Bestimmung_von_α

ΔE_A sei der Wert, gegen den die Asymptote für große HSA-Konzentrationen (beidenen das gesamte NPA in der Küvette als an HSA gebunden zu betrachten ist; siehe Kurve für HSA bei 37,0 °C in Abb.5) konvergiert. NPA'_b läßt sich nach folgender Beziehung ermitteln, ohne daß an dieser Stelle eine zusätzliche Bestimmung von NPA_t außerhalb dieser Meßreihe nötig wird:

$$\begin{aligned} NPA'_b &= \frac{NPA_b}{NPA_t} \\ &= \frac{\Delta E / \Delta \epsilon' d}{\Delta E_A / \Delta \epsilon' d} \quad (\text{nach Gl. 5}) \\ &= \frac{\Delta E}{\Delta E_A} \end{aligned}$$

Ziel ist, einen Ausdruck für HSA_t / NPA_t zu finden, in dem der Fehler beim Einwiegen des HSA eliminiert ist.

Zu diesem Zweck wird $\Delta \epsilon'$ gemäß Gleichung 5 im linearen Anfangsteil der Meßreihe (siehe Abb.5) aus dem Anstieg der Extinktionswerte ΔE gegenüber HSA_t bestimmt. Diesem Verfahren liegt die nach Abb.4 berechnete Annahme zugrunde, daß bei hohem NPA-Überschuß in diesem Bereich die Bindungsstelle am HSA in erster Näherung vollständig mit NPA besetzt ist (d.h. $NPA_b \approx HSA_t$): $\Delta \epsilon' = 1/d (\Delta E / HSA_t)$ $HSA \ll NPA$

$$\frac{HSA_t}{NPA_t} = \frac{HSA_t \Delta \epsilon' d}{\Delta E_A} \quad (9)$$

$$\frac{HSA_t}{NPA_t} = \frac{HSA_t d}{\Delta E_A} \left\{ \frac{1}{d} \left(\frac{\Delta E}{HSA_t} \right) HSA \ll NPA \right\} \quad (10)$$

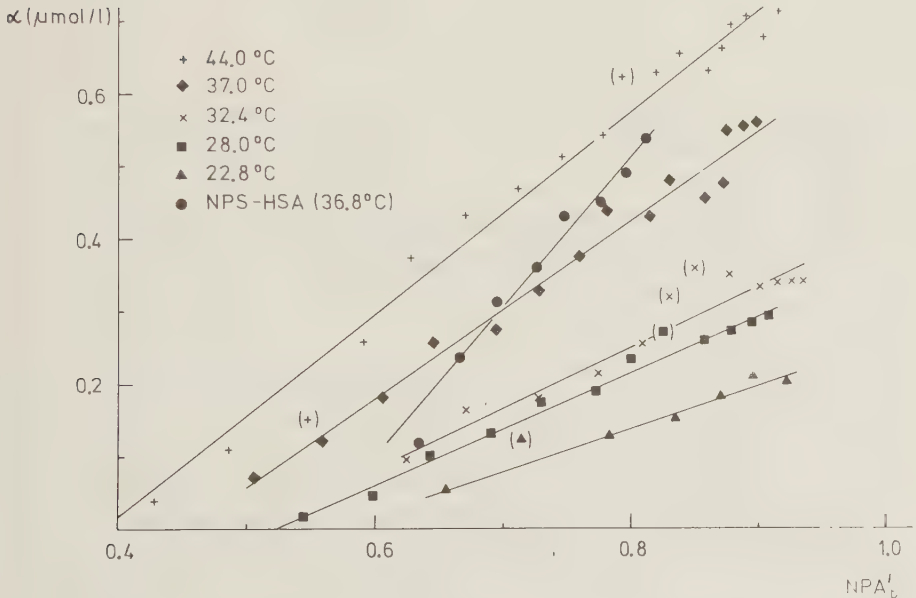
Wird die gesuchte Größe nach Gleichung 9 bestimmt, so zeigt Gleichung 10, daß sowohl der Fehler durch das Einwiegen des HSA als auch der systematische Pipettier-Fehler für HSA nicht eingehen.

Zu diskutieren verbleibt noch der erste der drei Faktoren von α (Gleichung 7). Würde NPA_t auch hier gemäß $NPA_t = \Delta E_A \Delta \epsilon'^{-1} d^{-1}$ bestimmt, so ginge nach den gerade aus-

geführten Überlegungen der Einwiegefehler für HSA in die Messung ein, der größer zu veranschlagen ist als ein Fehler aus einer rein photometrischen Messung. Deshalb wurde die NPA-Konzentration der Stammlösung mit dem von HANSTEIN (1979) angegebenen Extinktionskoeffizienten für NPA ermittelt und NPA_t aus den pipetierten Volumina errechnet.

4.1.3 Thermodynamik

Abb.6 Temperaturabhängigkeit der Bindung von NPA an HSA sowie die NPA-Bindung an durch NPS an der Stelle Trp 214 modifiziertes HSA



NPA'_b ist das Verhältnis von an der untersuchten Stelle gebundenem zu dort maximal möglichem gebundenem NPA. Der Anstieg der jeweiligen Regressionsgeraden ist gleich der Dissoziationskonstanten.
50 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7,4

Bei zunehmender Temperatur ist ein wachsender Anstieg der Regressionsgeraden bei der Auftragung von α gegen NPA'_b zu verzeichnen (Abb.6), und die Dissoziationskonstante für die NPA-Bindung an HSA nimmt somit größere Werte an (siehe Gl.8).

Tab.1 Die Temperaturabhängigkeit der experimentell bestimmten Assoziationskonstante für die Bindung von NPA an HSA

Temperatur °C	K_{A-1} M^{-1}
22,8	$1,67 \times 10^6$
28,0	$1,29 \times 10^6$
32,4	$1,19 \times 10^6$
37,0	$8,08 \times 10^5$
44,0	$7,17 \times 10^5$

Ist R die molare Gaskonstante, T die absolute Temperatur, $\{K_A\}$ die Maßzahl der in M^{-1} angegebenen Assoziationskonstanten für die Bindung von NPA an HSA, ΔH die Enthalpie- und ΔS die Entropieänderung, so gilt für die Änderung der Freien Energie unter Standardbedingungen ΔG_o :

$$\Delta G_o = -R T \ln\{K_A\}$$

und
$$\Delta G_o = \Delta H - T \Delta S$$

Daraus folgt:

$$\ln\{K_A\} = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} \quad (11)$$

ΔH ist demnach gleich dem Produkt aus $-R$ und der Steigung der Regressionsgeraden in der Auftragung von $\ln\{K_A\}$ gegen $1/T$ (Abb.7), und ΔS ist gleich dem Produkt aus R und dem Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden:

$$\Delta H = -7,75 \text{ kcal mol}^{-1} \quad (= -32,4 \text{ kJ mol}^{-1})$$

$$\Delta S = 2,26 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \quad (= 9,46 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1})$$

bei 25 °C: $-T \Delta S = -0,673 \text{ kcal mol}^{-1} \quad (= -2,82 \text{ kJ mol}^{-1})$

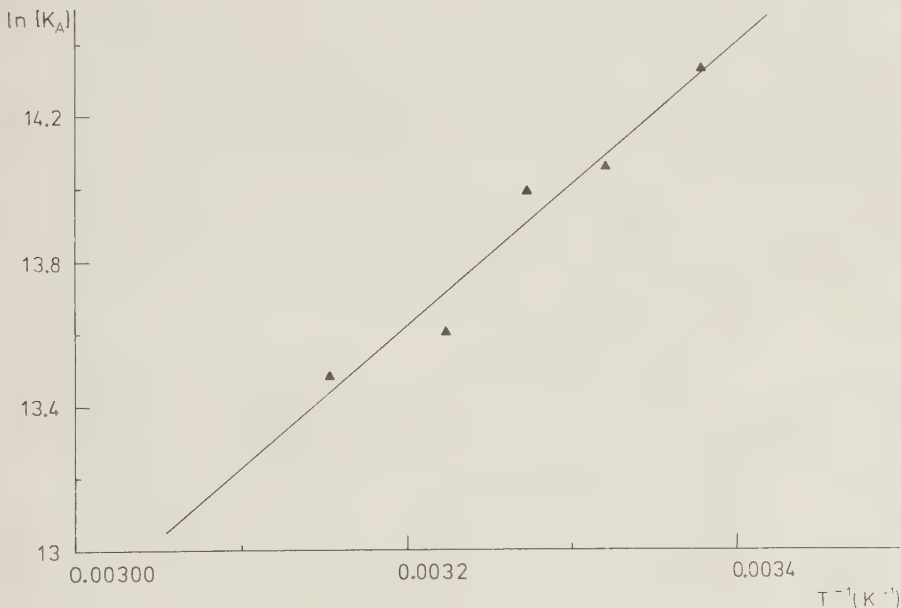
Die Gleichung

$$\ln\{K_A\} = 3900 \frac{1}{T} + 1,14 \quad (r = 0,976)$$

der Regressionsgeraden (Abb.7) wurde auch verwendet, um die Assoziationskonstante bei 37 °C genauer zu interpolieren:

$$K_A = 9,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \quad (K_D = 1,1 \text{ } \mu\text{M})$$

Abb.7 Temperaturabhängigkeit der Bindung von NPA an HSA



$\{K_A\}$ ist die Maßzahl der in M^{-1} angegebenen Assoziationskonstanten für die Bindung von NPA an HSA, T die absolute Temperatur

4.1.3.1 Abschätzung der Meßgenauigkeit für ΔH und ΔS

a) Fehlerabschätzung für ΔH

Es wurde zur Bestimmung der Steigung von $\ln\{K_A\}$ in Abhängigkeit von T^{-1} diesmal nicht der Anstieg der Regressionsgeraden in Abb.7 verwendet, sondern die fünf Geraden durch je einen Meßpunkt und den Ordinatenabschnitt der Regres-

sionsgeraden aus Abb.7 berechnet. Aus diesen Steigungen wurden nach Gleichung 11 fünf Werte für ΔH errechnet. Der Mittelwert beträgt

$$\overline{\Delta H} = -7,75 (\pm 0,05) \text{ kcal/mol}$$

b) Fehlerabschätzung für ΔS

Aus Gleichung 11 folgt:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T} + R \ln\{K_A\} \quad (12)$$

Wird der sicherlich geringe Fehler bei der Temperaturmessung vernachlässigt, setzt sich der Fehler für ΔS ($d\Delta S$) somit aus einem Anteil $d\Delta H/T$ und einem zweiten $d(R \ln\{K_A\})$ zusammen.

Fehlerabschätzung für $\ln\{K_A\}$

-- Wird wegen des Pipettierens ein Fehler für K_A von 10 % angenommen, so ergibt sich:

$$\begin{aligned} d(R \ln\{K_A\}) &= R (d\{K_A\} / \{K_A\}) \\ &= 0,19 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \end{aligned}$$

-- Eine zweite Möglichkeit $d(R \ln\{K_A\})$ abzuschätzen beruht auf dem Betrachten der Differenzen zwischen $\ln\{K_A\}$ der experimentell ermittelten Assoziationskonstanten und den $\ln\{K_A\}$ -Werten der Regressionsgeraden in Abb.7 an den entsprechenden Stellen.

Aus der Summe aus dem Mittelwert und der Standardabweichung dieser fünf Differenzen folgt:

$$d(R \ln\{K_A\}) = 0,20 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

Beide unabhängig voneinander durchgeführten Abschätzungen führen somit zu demselben Ergebnis für $d(R \ln\{K_A\})$. Der Gesamtfehler von ΔS wird nach Gleichung 12 wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} d\Delta S &= \left\{ \left(\frac{d\Delta H}{T} \right)^2 + d(R \ln\{K_A\})^2 \right\}^{1/2} \\ &= 0,24 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \quad \text{für } T = 307 \text{ K} \end{aligned}$$

Für die Enthalpie und Entropie ergibt sich also bei der Bindung von NPA an HSA:

$$\begin{aligned}
 \Delta H &= -7,75 (\pm 0,05) \text{ kcal mol}^{-1} \\
 &= -32,4 (\pm 0,21) \text{ kJ mol}^{-1} \\
 \Delta S &= 2,26 (\pm 0,24) \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \\
 &= 9,46 (\pm 1,02) \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \\
 -T \Delta S &= -0,673 (\pm 0,07) \text{ kcal mol}^{-1} \quad \text{bei } 25^\circ \text{C} \\
 &= -2,82 (\pm 0,30) \text{ kJ mol}^{-1}
 \end{aligned}$$

Es wurde noch ein zweiter Weg beschritten, um die Größenordnung der Bindungsenergie zu bestimmen.

Aus der Frequenzverschiebung $\Delta\nu$ des Maximum im Spektrum des gebundenen zum Maximum des freien NPA (Abb.3) kann die Energie ΔE berechnet werden, die im gebundenen NPA-Zustand zusätzlich gegenüber dem freien Zustand vonnöten ist, um den wahrscheinlichsten Elektronenübergang herbeizuführen. Unter der Annahme, daß bei den in Abb.3 gewählten molaren Verhältnissen nur gebundenes NPA vorliegt, gilt:

$$\Delta E = h \Delta\nu = 4,52 \times 10^{-24} \text{ kcal}$$

Durch Multiplikation mit der Avogadroschen Konstanten ergibt sich die zusätzlich benötigte Energie pro mol gebundenes NPA:

$$\Delta E' = 2,7 \text{ kcal/mol} \quad (= 11,3 \text{ kJ/mol})$$

Ein ähnliches Spektralverhalten, die "negative Solvatochromie", ist zu erwarten, wenn freie Elektronenpaare durch Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Wechselwirkungen beansprucht werden. Der Grundzustand wird dann mehr stabilisiert als die Anregungszustände, so daß die Anregungsenergie um diese Differenz der Solvationsenergien vergrößert ist. Das hat einen "blue shift" im Spektrum zur Folge (nach STAAB, 1959).

Im hier untersuchten Fall resultiert eine Erhöhung der Anregungsenergie bei 37°C um $2,7 \text{ kcal/mol}$, was größenordnungsmäßig der Bindungsenergie von Wasserstoffbrücken (3 bis 10 kcal/mol , STAAB, 1959) entspricht, wie auch die oben angegebene Enthalpieänderung.

4.2 Verdrängung des NPA vom HSA

4.2.1 Meßverfahren

NPA und HSA lagen in einem molaren Verhältnis von 4,3 : 1 vor, so daß die untersuchte Bindungsstelle zu Beginn der Meßreihe fast vollständig mit NPA besetzt war. Es wurde schrittweise eine Substanz I zugegeben, die auf ihre Hemmung der NPA-Bindung an HSA untersucht werden sollte. Falls I NPA freisetzt, wäre nach Abb.3 eine Erhöhung von $E = E_{450} - E_{500}$ zu erwarten. In Analogie zur Gleichung 6 wurde für die Inhibitionsversuche definiert:

$$\Delta E = E_{\text{mit I}} \frac{V_n}{V_o} - E_{\text{ohne I}}$$

Ist ΔNPA_f das durch I freigesetzte NPA, ergibt sich eine Beziehung ähnlich der Gleichung 5 :

$$\Delta E = \Delta NPA_f \quad \Delta \epsilon' \quad d \quad (13)$$

ΔE ist somit ein Maß für das nach Zugabe von I an der beobachteten Stelle freigesetzte NPA und im Fall einer kompetitiven Inhibierung durch Bindung von I an derselben Stelle ein Maß für den an dieser Stelle gebundenen Anteil von I (siehe die für ΔE_{corr} eingezeichnete Kurve in Abb.8).

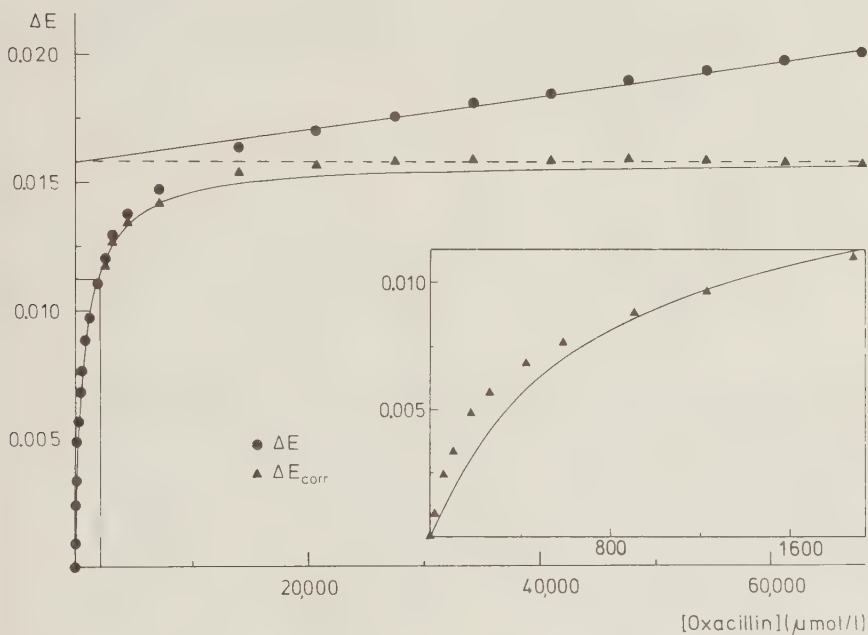
Durch Kontrollmessungen wurde jeweils abgesichert, daß nicht durch Interaktionen zwischen NPA und I oder HSA und I allein Exktinktionsänderungen hervorgerufen werden, die in der Meßreihe eine NPA-Verdrängung nur vortäuschen würden.

4.2.1.1 Modifizierte Dixon-Auftragung

Ziel ist, für den Fall einer kompetitiven Inhibierung der NPA-Bindung eine Beziehung herzuleiten, die aus der NPA-Verdrängung die Dissoziationskonstante $K_{D,I}$ für den Komplex

I-HSA an der mit dieser Methode beobachtbaren Stelle errechnen läßt.

Abb.8 Inhibierung der Bindung von NPA (10 μM) an HSA (2,3 μM) durch Oxacillin



In der Abszisse ist die totale Oxacillinkonzentration aufgetragen. ΔE_{corr} gibt den Meßwert ΔE wieder, der um die nicht-Bindungsstellen-spezifische Extinktionsänderung vermindert wurde. Die für ΔE_{corr} eingezeichneten Kurven sind mit der Assoziationskonstanten errechnet, die aus der modifizierten Dixon-Auftragung stammt. 50 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7,4 ; 37 °C

Aus dem Massenwirkungsgesetz läßt sich ableiten:

$$K'_{D,NPA} = K_{D,NPA} \left(1 + \frac{I_f}{K_{D,I}} \right) \quad (14)$$

($K_{D,NPA}$ ist die Dissoziationskonstante, und $K'_{D,NPA}$ ist die in Anwesenheit von I apparente Dissoziationskonstante des

Komplexes NPA-HSA. I_f ist die molare Konzentration an freiem I.)

Eine entsprechende Beziehung für kompetitive Enzymhemmung beschreibt SEGEL (1975).

HSA_f sei die molare Konzentration derjenigen HSA-Moleküle, die an der untersuchten Stelle frei sind von NPA (wohl aber fast alle mit I besetzt sind). $NPA_{b,max}$ sei die molare Konzentration des maximal an der Stelle gebundenen NPA (=HSA).

$$\begin{aligned} \frac{NPA_f HSA_f}{NPA_b} &= K'_{D,NPA} \\ \frac{NPA_f (NPA_{b,max} - NPA_b)}{NPA_b} &= K'_{D,NPA} \\ NPA_f NPA_{b,max} &= NPA_b (NPA_f + K'_{D,NPA}) \quad (15) \\ \frac{NPA_{b,max}}{NPA_b} &= 1 + \frac{K_{D,NPA}}{NPA_f} \left(1 + \frac{I_f}{K_{D,I}}\right) \text{ (nach Gl.14)} \end{aligned}$$

Würde dieser Gleichung folgend $1/NPA_b$ in Abhängigkeit von I_f aufgezeichnet, entspräche dieses Vorgehen formal der Dixon-Auftragung für kompetitive Enzymhemmung (SEGEL, 1975). Da aber NPA_f bei dem oben erwähnten Verhältnis NPA : HSA bis zur vollständigen Verdrängung um fast 20 % zunimmt, wäre in diesem Fall keine lineare Beziehung zwischen I_f und $1/NPA_b$ zu erwarten. Deshalb wird die Gleichung so umgeformt, daß NPA_f mit in die Ordinatenwerte eingeht:

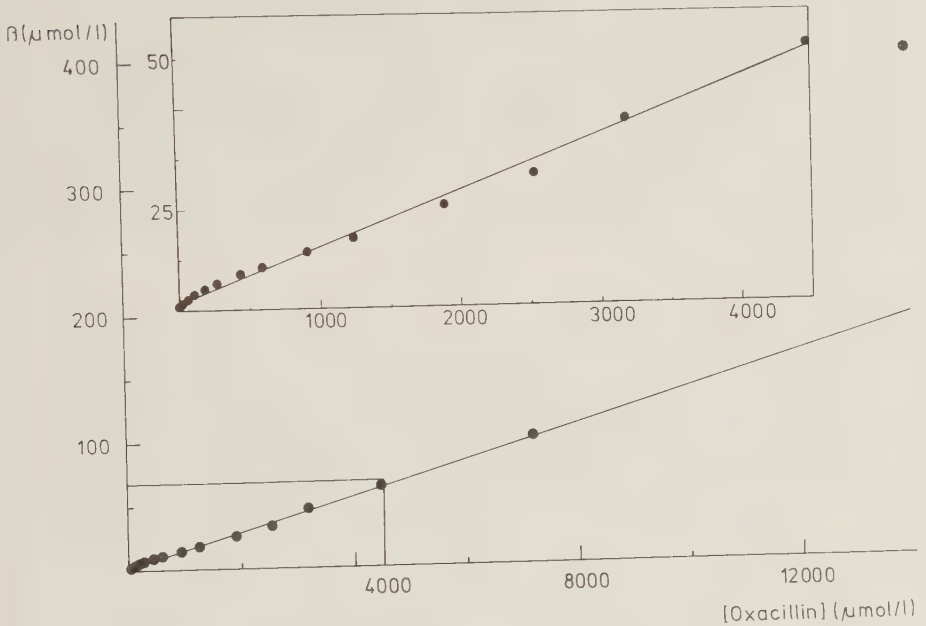
$$\left(\frac{NPA_{b,max}}{NPA_b} - 1\right) NPA_f = K_{D,NPA} + \frac{K_{D,NPA}}{K_{D,I}} I_f \quad (16)$$

Zur Vereinfachung wird der linke Term β genannt:

$$\beta = K_{D,NPA} + \frac{K_{D,NPA}}{K_{D,I}} I_f \quad (17)$$

Wird β gegenüber I_f aufgetragen (als Beispiel Abb.9), ist die Steigung der Regressionsgeraden nach dieser Beziehung gleich dem Verhältnis der bereits bekannten Dissoziationskonstanten für NPA-HSA zu der gesuchten für I-HSA an der beobachteten Stelle. Das bedeutet, je größer der Geradenanstieg ist, desto höher ist die Affinität von I. Der Ordinatenabschnitt ist gleich $K_{D,NPA}$.

Abb.9 modifizierte Dixon-Auftragung für die Inhibierung der Bindung von NPA (10 μM) an HSA (2,3 μM) durch Oxacillin



50 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7.4 ; 37 °C

Nach Gleichung 17 ist β gegen die Konzentration des ungebundenen Inhibitors aufzutragen, die mit diesem Verfahren nicht direkt meßbar ist. Der Anteil an der gesamten Inhibitorkonzentration, der an der beobachteten Stelle gebunden ist, läßt sich aber aus den Meßwerten abschätzen. Er ist für die meisten in dieser Arbeit untersuchten Substanzen kleiner als 1 %. Nur für Substanzen, deren Affinitäten zu HSA in der Größenordnung von NPA liegen, sind die Unterschiede bedeutender. So betragen sie in der Meßreihe für Phenylbutazone zwischen 5% und 10 %. Wird β gegen Phenylbutazonekonzentrationen aufgetragen, die um den an der

untersuchten Stelle gebundenen Anteil vermindert sind, ist das Ergebnis eine nur um 5% größere Assoziationskonstante.

Da für die meisten Substanzen noch von weiteren, mit dieser Methode nicht "sichtbaren" Bindungsstellen am HSA berichtet wird, deren Einfluß auf I_f daher auch nicht meßbar ist, wurde in Anbetracht eines Fehlers, der zumeist kleiner ist als 5%, auf eine Korrektur der Inhibitorkonzentrationen verzichtet und β gegen die totale Inhibitorkonzentration aufgetragen.

4.2.1.1.1 Bestimmung von β

Wie Abb.8 zeigt, ist die Asymptote für ΔE bei großen Inhibitorkonzentrationen, die NPA fast vollständig von der beobachteten Stelle verdrängen, nicht, wie zu erwarten wäre, parallel zur Abszisse (durchgezogene Gerade in Abb.8).

Man kann aber abschätzen, daß ihre positive Steigung zum größten Teil auf für die beobachtete Stelle nicht spezifische Extinktionsänderungen zurückzuführen sind. So tragen die Eigenabsorption von Oxacillin über 10 % und die Volumenverluste beim wiederholten Einbringen des Inhibitors in die Küvette mit einem Glasstäbchen zusammen mit der bei 37 °C in einem Zeitraum von 1,5 bis 2 Stunden für eine Meßreihe nicht unbeträchtliche Verdunstung zu über 60 % der Steigung bei. Es ist weiterhin denkbar, daß noch Verdrängungsprozesse an möglichen sekundären Bindungsstellen einen, wenn auch nach Abb.4 nur geringen, Anteil an der Extinktionszunahme beisteuern.

Deshalb wurde im Folgenden nur noch mit ΔE_{corr} gerechnet, die gleich sind der Differenz aus den Meßwerten ΔE und dem Produkt aus dem Asymptotenanstieg und der jeweiligen Inhibitorkonzentration (Abb.8).

Nach den Gleichungen 16 und 17 ist

$$\beta = \left(\frac{NPA_{b,max}}{NPA_b} - 1 \right) NPA_f$$

a) Bestimmung des ersten Faktors:

Die Asymptote ΔE_A für ΔE_{corr} bei hohen Inhibitorkonzentrationen (siehe gestrichelte Linie in Abb.8) gibt nach Gleichung 13 die Konzentration des zu Beginn der Meßreihe (d.h. in Abwesenheit von I) gebundenen NPA wieder:

$NPA_{b,o} = \Delta E_A \Delta \epsilon^{-1} d^{-1}$. Ist $NPA_{f,o}$ die Konzentration des freien NPA des ersten Meßpunktes (ohne I), gilt nach Gleichung 15:

$$NPA_{b,max} = NPA_{b,o} \frac{NPA_{f,o} + K'_{D,NPA}}{NPA_{f,o}} = NPA_{b,o} F$$

Der zur Berechnung des Faktors $F = (NPA_{f,o} + K'_{D,NPA}) / NPA_{f,o}$ notwendige Wert für $NPA_{f,o}$ ergibt sich aus den eingebrachten Konzentrationen von HSA_t und NPA_t sowie der bekannten Dissoziationskonstanten für NPA-HSA, die hier auch identisch ist mit $K'_{D,NPA}$, da noch kein Inhibitor zugefügt wurde.

Das nach Zugabe von I noch gebundene NPA ist gleich der Differenz aus dem anfangs gebundenen ($\Delta E_A \Delta \epsilon^{-1} d^{-1}$) und dem durch I freigesetzten NPA ($\Delta E \Delta \epsilon^{-1} d^{-1}$).

Der erste Faktor von β ist daher

$$\frac{\Delta E_A \Delta \epsilon^{-1} d^{-1} F}{(\Delta E_A - \Delta E) \Delta \epsilon^{-1} d^{-1}} - 1 = \frac{\Delta E_A F}{\Delta E_A - \Delta E} - 1$$

b) Für den zweiten Faktor gilt:

$$\begin{aligned} NPA_f &= NPA_t - NPA_b \\ &= NPA_t - HSA_t \frac{NPA_b}{NPA_{b,max}} \\ &= NPA_t - HSA_t \frac{(\Delta E_A - \Delta E) \Delta \epsilon^{-1} d^{-1}}{\Delta E_A \Delta \epsilon^{-1} d^{-1} F} \end{aligned}$$

β wurde daher bestimmt nach der Beziehung

$$\beta = \left(\frac{\Delta E_A F}{\Delta E_A - \Delta E} - 1 \right) \left(NPA_t - HSA_t \frac{\Delta E_A - \Delta E}{\Delta E_A F} \right) \quad (18)$$

4.2.1.2 Hill-Auftragung

Y sei das Verhältnis der molaren Konzentration des an der beobachteten Stelle gebundenen I zu der Konzentration des maximal gebundenen I :

$$Y = \frac{I_b}{I_{b,max}} = \frac{I_b}{HSA_t} \quad (19)$$

Bei Annahme kompetitiver Inhibition der NPA-Bindung durch Bindung von I an der beobachteten Stelle ist

$$I_b = \Delta NPA_f = \Delta E \Delta \epsilon'^{-1} d^{-1} \quad (\text{nach GL. 13})$$

Zur Bestimmung von β wurde für $NPA_{b,o}$ eine Beziehung hergeleitet, die hier für $\Delta \epsilon'$ benutzt wird:

$$\Delta \epsilon' = \Delta E_A NPA_{b,o}^{-1} d^{-1}$$

Somit ist

$$Y = \frac{\Delta E NPA_{b,o}}{HSA_t \Delta E_A}$$

wobei $NPA_{b,o}$ aus den eingebrachten Konzentrationen für HSA_t und NPA_t sowie der Dissoziationskonstanten für NPA-HSA errechnet wurde.

Bei der Hill-Auftragung ist $\log(Y/1-Y)$ in Abhängigkeit von $\log I_f$ zu zeichnen (SEGEL, 1975). Jedoch sind die Schwierigkeiten bei der Bestimmung von I_f schon unter 4.2.1.1 diskutiert worden. Deshalb wurde auch hier bei Substanzen mit deutlich geringerer Affinität zur Bindungsstelle als NPA $\log I_t$ als Abszisse verwendet. Nur bei Salicylsäure, Indomethacin, Phenylbutazone und Dicumarol wurde I_t um $I_b (= \Delta NPA_f)$ vermindert. Dabei wurden in den Hill-Auftragungen Steigungen größer als 1 größer und Steigungen kleiner als 1 kleiner. Diese Änderungen lagen zwischen 2 und 10 %.

4.2.1.2.1 Bestimmung der Dissoziationskonstanten für I-HSA aus der Hill-Auftragung

Für $\log(Y/1-Y) = 0$ gilt: $Y = 1/2$.

Nach Gleichung 19 folgt daraus $I_b = \text{HSA}_t/2$ und daher auch $\text{HSA}_{f,I} = \text{HSA}_t/2$, wobei $\text{HSA}_{f,I}$ die molare Konzentration des an der beobachteten Stelle von I freien HSA ist.

Für die Stelle $\log I_{f,0}$, an der $\log(Y/1-Y)$ gleich 0 ist, gilt deshalb bezüglich der in Anwesenheit von NPA apparenten Dissoziationskonstanten $K'_{D,I}$ des Komplexes I-HSA:

$$\begin{aligned} K'_{D,I} &= \frac{I_{f,0} \text{HSA}_{f,I}}{I_b} \\ &= \frac{I_{f,0} \text{HSA}_t/2}{\text{HSA}_t/2} \\ &= I_{f,0} \end{aligned}$$

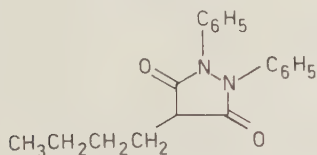
Mit folgender der Gleichung 14 entsprechenden Beziehung läßt sich dann die Dissoziationskonstante für I-HSA an der beobachteten Stelle berechnen:

$$\begin{aligned} K_{D,I} &= \frac{K'_{D,I}}{1 + \text{NPA}_f/K_{D,\text{NPA}}} \\ &= \frac{I_{f,0}}{1 + \text{NPA}_f/K_{D,\text{NPA}}} \end{aligned}$$

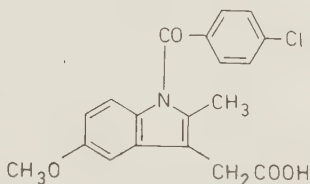
4.2.2 Phenylbutazone und Indomethacin

Abb.10

Phenylbutazone

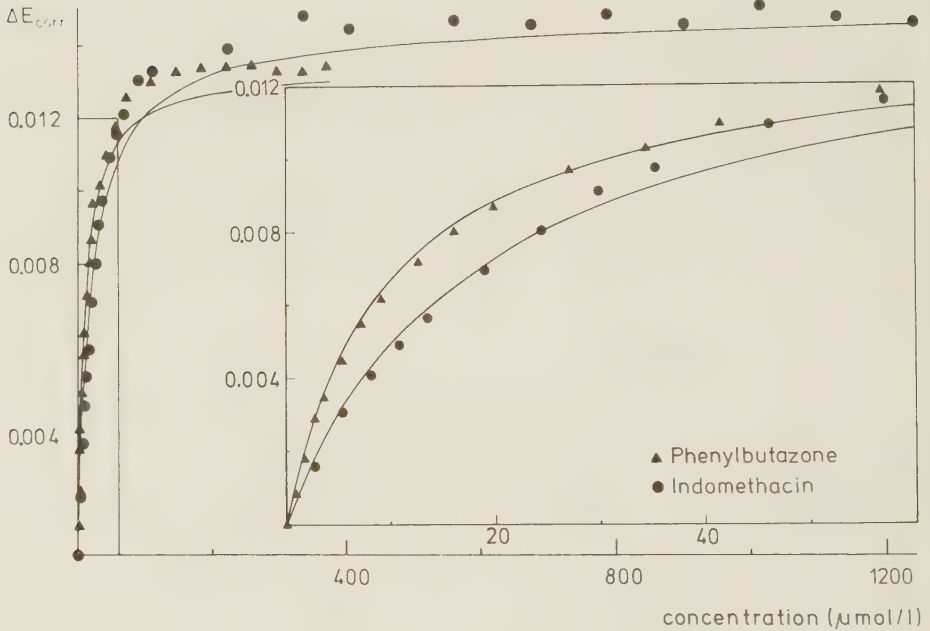


Indomethacin



(WINDHOLZ, 1976)

Abb.11 Inhibierung der Bindung von NPA (10 μM) an HSA (2,3 μM) durch Phenylbutazone und Indomethacin



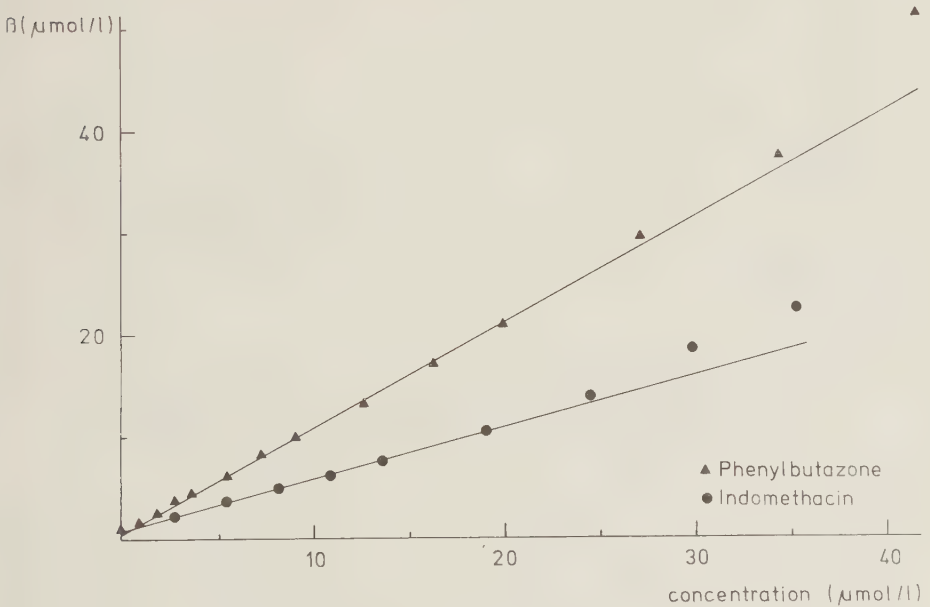
In der Abszisse sind die totalen Konzentrationen aufgetragen. Die eingezeichneten Kurven sind mit den Assoziationskonstanten errechnet, die aus den modifizierten Dixon-Auftragungen stammen.
200 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7.4; 37 ° C

Die Abb.11 zeigt, daß Phenylbutazone und Indomethacin die NPA-Bindung an der untersuchten Stelle vermindern. In der modifizierten Dixon-Auftragung (Abb.12) liegen die Punkte für Phenylbutazone bis zu einer NPA-Ablösung von 77 % auf einer Geraden ($r=0,9991$) und bei Indomethacin bis 62 % ($r=0,998$). Diese Beobachtung deute ich als kompetitive Bindung an der untersuchten Stelle von Phenylbutazone und NPA sowie Indomethacin und NPA.

Da Phenylbutazone ein spezifischer Marker für die Stelle I

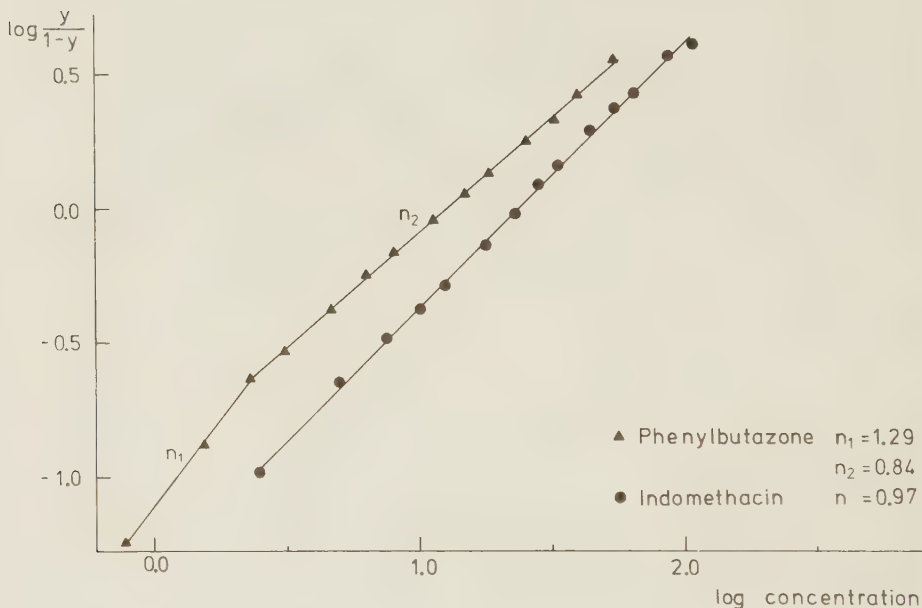
ist, wie in Kapitel 5.1.3.1 eingehend diskutiert wird, ist die beobachtete Bindungsstelle somit die Stelle I. Die folgenden Punkte (in Abb.12 gehören für Phenylbutazone der letzte und für Indomethacin die letzten beiden Punkte dazu) liegen zunehmend oberhalb der Regressionsgeraden. Die Abweichung spiegeln auch die in Abb.11 eingezeichneten Kurven wieder, die mit den aus der modifizierten Dixon-Auftragung ermittelten K_A errechnet wurden.

Abb.12 modifizierte Dixon-Auftragung der Meßreihen von Abb.11



Aus der modifizierten Dixon-Auftragung resultiert im linearen Bereich für Phenylbutazone $K_A = 9,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ und für Indomethacin $K_A = 4,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Aus der Hill-Auftragung folgt $K_A = 7,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ beziehungsweise $K_A = 4,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Abb.13 Hill-Auftragung der Meßreihen von Abb.11



Y ist das molare Verhältnis von an der untersuchten Stelle gebundenen zu dort maximal gebundenen Substanz. In der Abszisse ist die Differenz aus der Gesamtkonzentration und der an dieser Stelle gebundenen Konzentration aufgetragen. n ist die Steigung.

Die Phenylbutazonekurve in Abb.13 zeigt für die ersten Meßpunkte einen steileren Anstieg als bei den folgenden. SEGEL (1975) führt aus, daß bei Hill-Auftragungen, in denen die Konzentration des totalen statt des freien Liganden verwendet wird, im Bereich niedriger Konzentration ein abnorm hoher Anstieg vorliegen kann, falls ein signifikanter Anteil der totalen Konzentration gebunden ist. Die aufgetragenen Konzentrationen in Abb.13 sind zwar um an die beobachtete Stelle gebundenen Substanzmengen vermindert, aber für Phenylbutazone beschreibt CHKRABARTI (1978) noch eine sekundäre Bindungsstelle mit $K_A = 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, deren Einfluß auf

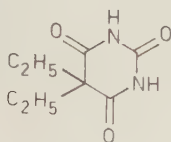
die Konzentration des freien Phenylbutazone mit dieser Methode nicht erfaßbar ist. Daher messe ich diesen ersten Punkten bei der Beschreibung der zu untersuchenden Stelle keine Bedeutung zu.

Auffällig ist, daß bei der Hill-Auftragung im Gegensatz zur modifizierten Dixon-Auftragung die lineare Beziehung nicht schon bei 77 % beziehungsweise 62 % der NPA-Verdrängung endet, sondern für beide Substanzen erst oberhalb 90 % (Phenylbutazone: $r = 0,9997$, Indomethacin: $r = 0,9992$).

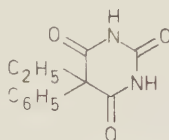
4.2.3 Barbiturate

Abb.14

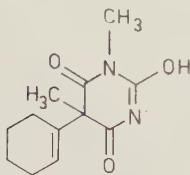
Barbital



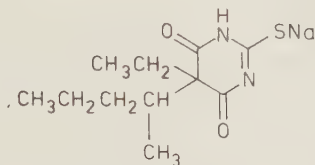
Phenobarbital



Hexobarbital



Thiopental

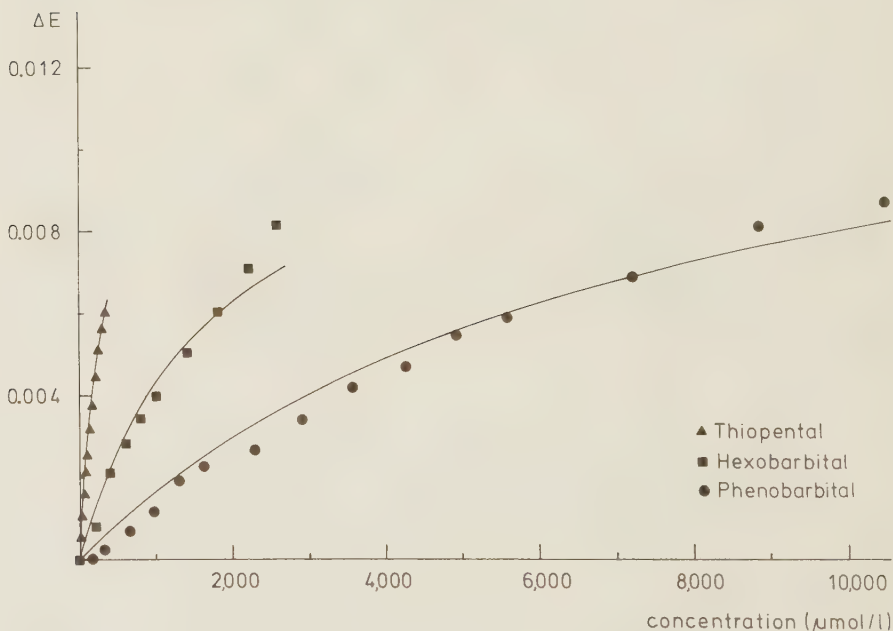


nach WINDHOLZ (1976)

Nach Abb.15 vermindern Phenobarbital, Hexobarbital und Thiopental die NPA-Bindung an der untersuchten Stelle. Da bei pH 7,4 Hexobarbital und Thiopental schon bei niedrigen Konzentrationen ausfallen und eine weitere Zugabe von

Phenobarbital zu einer pH-Änderung größer als 0,1 geführt hätte, mußte ihr Einfluß auf die NPA-Bindung mit Konzentrationen gemessen werden, die nur etwa 60 % einer vollständigen NPA-Verdrängung bewirkten. ΔE_A wurde anschließend durch Zugabe von Salicylsäure ermittelt.

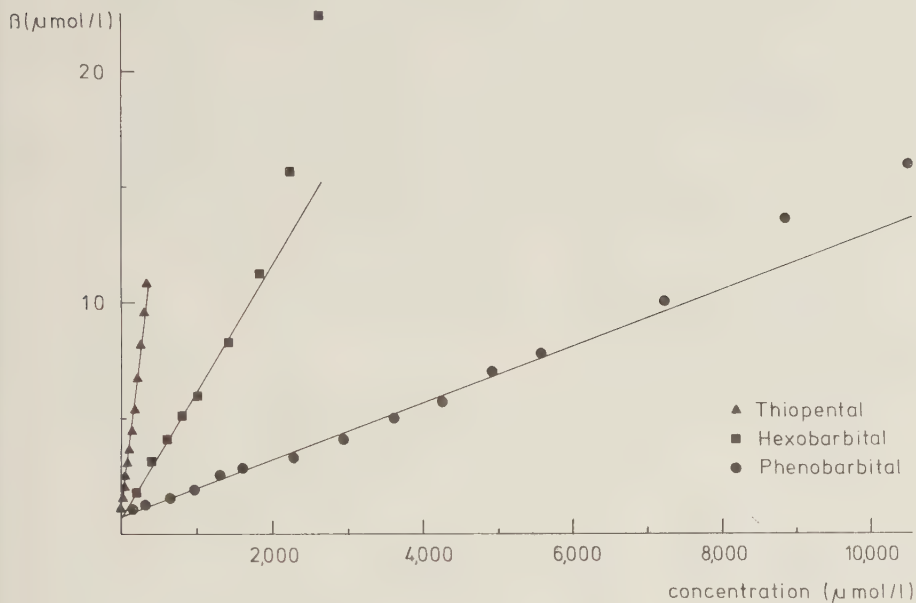
Abb.15 Inhibierung der Bindung von NPA (10 μM) an HSA (2,3 μM) durch Phenobarbital, Hexobarbital und Thiopental



Die eingezeichneten Kurven sind mit den Assoziationskonstanten errechnet, die aus den modifizierten Dixon-Auftragungen stammen. 37 °C; pH 7,4; Natriumphosphatpuffer a) bei Pheno- und Hexobarbital 200 mM b) bei Thiopental 50 mM

In der modifizierten Dixon-Auftragung (Abb.16) liegen die Punkte für Phenobarbital bis zu einer NPA-Ablösung von 47 %

Abb.16 modifizierte Dixon-Auftragung der Meßreihen von Abb.15



auf einer Geraden ($r=0,997$), bei Hexobarbital bis 50 % ($r=0,996$) und bei Thiopental alle Punkte, die ermittelt werden konnten ($r=0,996$). Daraus schließe ich, daß diese Barbiturate kompetitiv zu NPA an der beobachteten Stelle binden.

Aus der modifizierten Dixon-Auftragung resultiert für Phenobarbital $K_A = 1,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, für Hexobarbital $K_A = 5,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ und für Thiopental $K_A = 2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

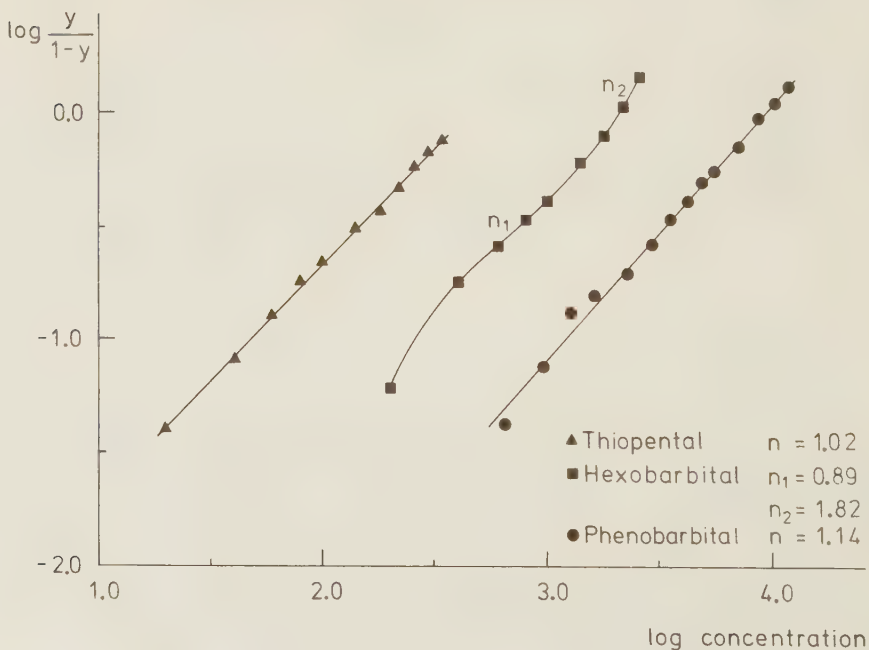
Aus der Hill-Auftragung folgt für Phenobarbital $K_A = 1,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, für Hexobarbital $K_A = 4,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ und für Thiopental $K_A = 2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Für Phenobarbital fällt auf, daß in der Hill-Auftragung (Abb.17) die lineare Beziehung ($r=0,997$) in einem größeren

Konzentrationsbereich als in der modifizierten Dixon-Auftragung besteht. Während auch für Thiopental die Meßpunkte auf einer Geraden liegen ($r = 0,9992$), weicht die Kurvenform für Hexobarbital von den anderen beiden ab.

Für Barbital waren wegen der zu geringen Löslichkeit bei noch akzeptabler pH-Verschiebung die verwendeten Konzentrationen ebenfalls begrenzt. Die mit diesen Barbital-Konzentrationen (bis $11650 \mu\text{M}$) erzielten Extinktionsänderungen waren so gering, daß die Assoziationskonstante für die Bindung nur grob abgeschätzt werden konnte: $K_A \leq 2,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

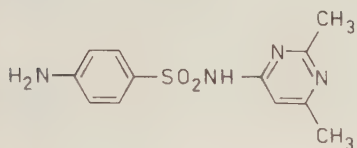
Abb.17 Hill-Auftragung der Meßreihen von Abb.15



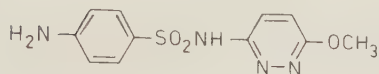
Y ist das molare Verhältnis von an der untersuchten Stelle gebundener zu dort maximal gebundener Substanz. In der Abszisse ist die Gesamtkonzentration aufgetragen.

4.2.4 Sulfonamide

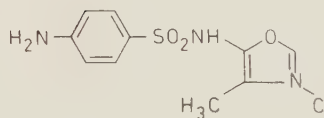
Abb.18 Sulfisomidine



Sulfamethoxypyridazine

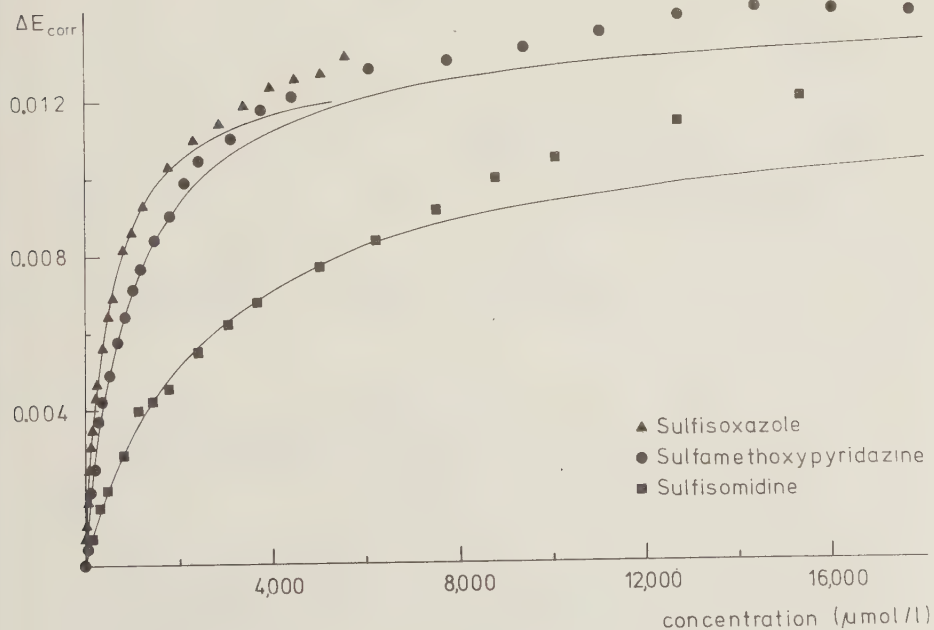


Sulfisoxazole



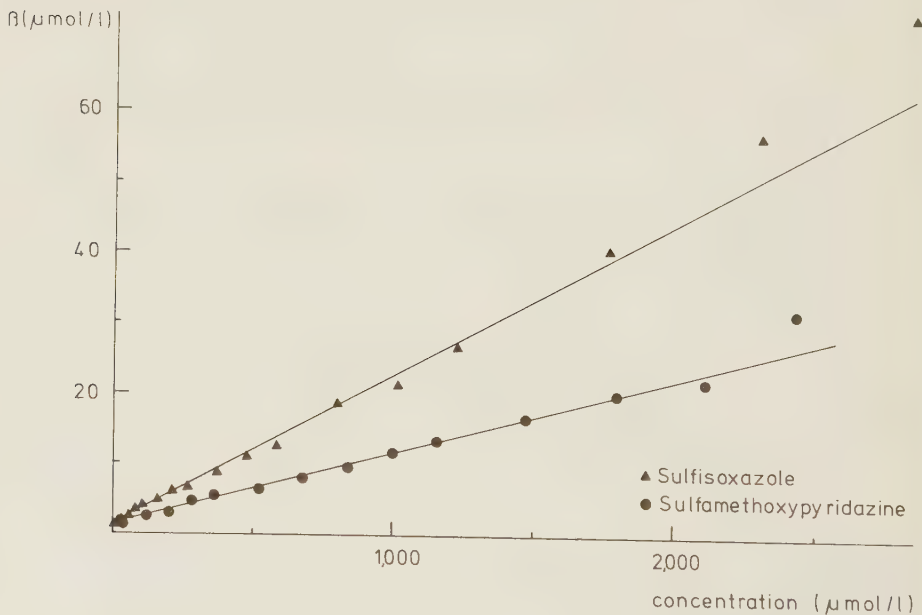
(WINDHOLZ, 1976)

Abb.19 Inhibierung der Bindung von NPA (10 μ M) an HSA (2,3 μ M) durch Sulfisoxazole, Sulfamethoxypyridazine und Sulfisomidine



Die eingezeichneten Kurven sind mit den Assoziationskonstanten errechnet, die aus den modifizierten Dixon-Auftragungen stammen.
200 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7,4; 37 °C

Abb.20 modifizierte Dixon-Auftragung der Meßreihen für Sulfisoxazole und Sulfamethoxyipyridazine von Abb.19

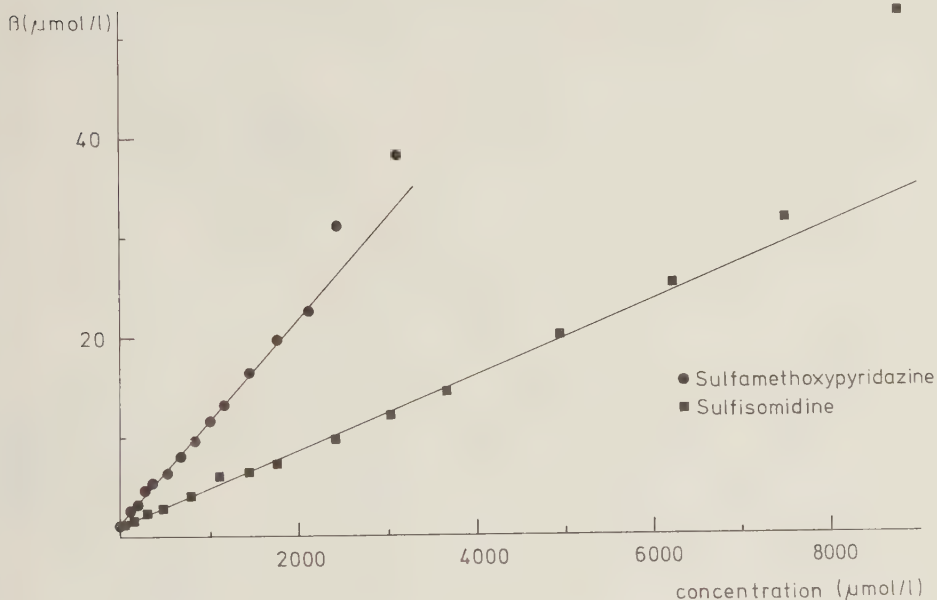


Nach Abb.19 vermindern Sulfisomidine, Sulfamethoxyipyridazine und Sulfisoxazole die NPA-Bindung an der untersuchten Stelle.

In den modifizierten Dixon-Auftragungen (Abb.20 und 21) liegen die Punkte für Sulfisoxazole bis zu einer NPA-Ablösung von 83 % auf einer Geraden ($r=0,9981$), für Sulfamethoxyipyridazine bis 64 % ($r=0,9992$) und für Sulfisomidine

bis 69 % ($r = 0,9986$). Daraus schließe ich, daß diese Sulfonamide kompetitiv zu NPA an der beobachteten Stelle binden.

Abb.21 modifizierte Dixon-Auftragung der Meßreihen für Sulfamethoxypyridazine und Sulfisomidine von Abb.19

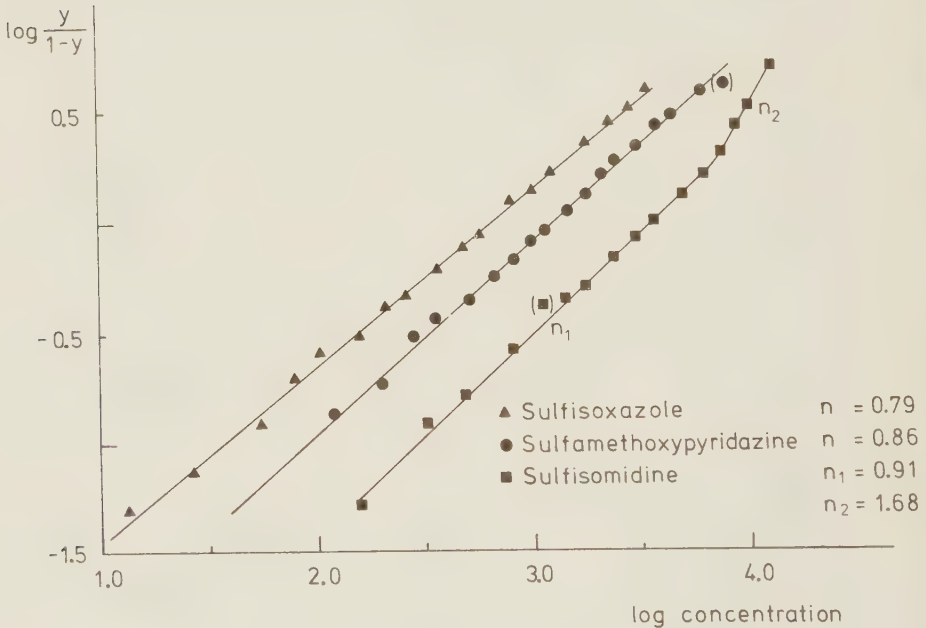


Die Punkte für Sulfamethoxypyridazine wurden hier nochmal zum Vergleich eingezeichnet.

Die folgenden Punkte, von denen in Abb.20 und 21 noch jeweils 1 oder 2 eingezeichnet sind, liegen wieder zunehmend oberhalb der Regressionsgeraden. Diese Abweichung ist auch bei den in Abb.19 eingezeichneten Kurven zu bemerken, die mit folgenden aus dem linearen Teil der modifizierten Dixon-Auftragungen ermittelten K_A errechnet wurden: für Sulfisomidine $K_A = 3,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, für Sulfamethoxypyridazine $K_A = 9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ und für Sulfisoxazole $K_A = 1,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Aus der Hill-Auftragung (Abb.22) folgt für Sulfisomidine $K_A = 2,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, für Sulfamethoxypyridazine $K_A = 7,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ und für Sulfisoxazole $K_A = 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Abb.22 Hill-Auftragung der Meßreihen von Abb.19



Y ist das molare Verhältnis von an der untersuchten Stelle gebundenen zu dort maximal gebundenen Substanz. In der Abszisse ist die totale Konzentration aufgetragen. n ist die Steigung. Die eingeklammerten Punkte wurden zur Errechnung der Regressionsgeraden nicht herangezogen.

4.2.5 Salicylate

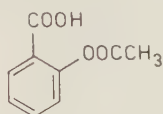
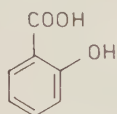
Salicylsäure hat im Gegensatz zu Acetylsalicylsäure bei 294 nm ein zusätzliches Absorptionsmaximum, mit dem bestimmt

wurde, daß bei 37 °C in 1,5 Stunden ungefähr 2,5 % der Acetylsalicylsäure in Salicylsäure übergeht. Deshalb wurde der Einfluß auf die NPA-Bindung von Acetylsalicylsäure und zum Vergleich auch der von Salicylsäure bei 20 °C gemessen. Die Temperatur der frisch angesetzten Stammlösung für Acetylsalicylsäure wurde während der Meßreihe ebenfalls auf 20 °C gehalten, und nach Beendigung der Reihe wurde photometrisch in ihr ein Salicylsäureanteil von 1,36 % ermittelt.

Abb.23

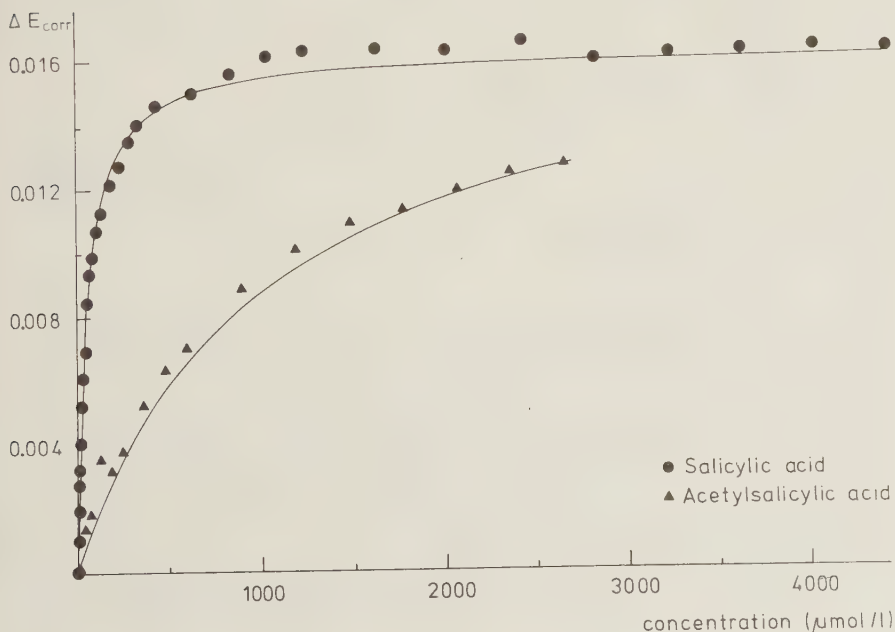
Salicylsäure

Acetylsalicylsäure



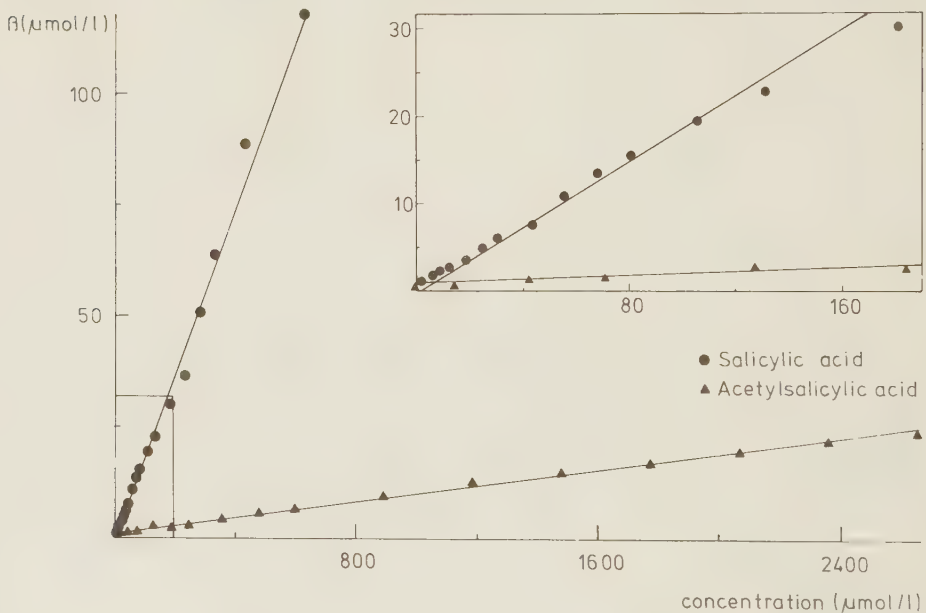
(WINDHOLZ, 1976)

Abb.24 Inhibierung der Bindung von NPA (10 µM) an HSA (2,3 µM) durch Salicylsäure und Acetylsalicylsäure



Die eingezeichneten Kurven sind mit den Assoziationskonstanten errechnet, die aus den modifizierten Dixon-Auftragungen stammen.
50 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7,4; 20 °C

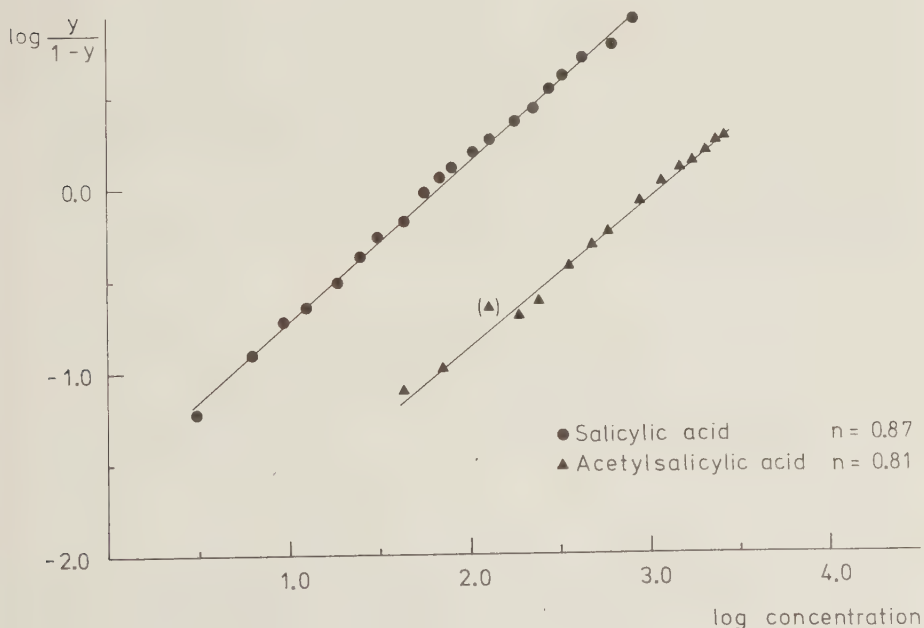
Abb.25 modifizierte Dixon-Auftragung der Meßreihen von Abb.24



der kompetitiven Inhibierung kommt auch in den in Abb.24 eingezeichneten Kurven zum Ausdruck, die mit folgenden aus der modifizierten Dixon-Auftragung stammenden K_A errechnet wurden¹: für Acetylsalicylsäure $K_A = 1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ und für Salicylsäure $K_A = 3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ bei 20 °C.

Da einerseits K_A für Acetylsalicylsäure 5,6 % der Konstanten für Salicylsäure beträgt, andererseits der Anteil der Salicylsäure an der Acetylsalicylsäure während der Meßreihe höchstens 1,4 % ausmacht (s.o.), ist ausgeschlossen, daß eine NPA-Verdrängung durch Acetylsalicylsäure zum überwiegenden Teil durch Salicylsäure vorgetäuscht wird.

Abb.26 Hill-Auftragung der Meßreihen von Abb.24



¹ Die hierfür verwendete Assoziationskonstante der Komplexes NPA-HSA bei 20 °C stammt aus der Regressionsgeraden von Abb.7.

Y ist das molare Verhältnis von an der untersuchten Stelle gebundenen zu dort maximal gebundenen Substanz. In der Abszisse ist für Acetylsalicylsäure die totale Konzentration aufgetragen und für Salicylsäure die Differenz aus der Gesamtkonzentration und der an dieser Stelle gebundenen Konzentration. n ist die Steigung.

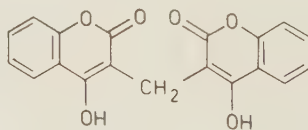
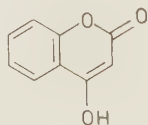
Die mit der modifizierten Dixon-Auftragung bestimmte Konstante für Salicylsäure bei 37 °C beträgt $K_A = 1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, wobei sich die Verhältnisse der Assoziationskonstanten von NPA und Salicylsäure nur um 3,5 % bei den beiden Temperaturen unterscheiden. Das mag als Anhalt dafür gelten, daß die Bindungsmechanismen an HSA für Salicylsäure denen von NPA ähnlich sind.

Aus der Hill-Auftragung resultiert bei 20 °C (Abb.26) für Acetylsalicylsäure $K_A = 1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ und für Salicylsäure $K_A = 2,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, wobei für Acetylsalicylsäure alle Punkte auf einer Geraden liegen ($r = 0,998$) und für Salicylsäure die Punkte bis 96 % der NPA-Verdrängung ($r = 0,9986$). Bei 37 °C ergab die Hill-Auftragung für Salicylsäure $K_A = 1,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, wobei die Beziehung bis 96 % der NPA-Verdrängung linear war ($r = 0,9998$).

4.2.6 Cumarin-Derivate

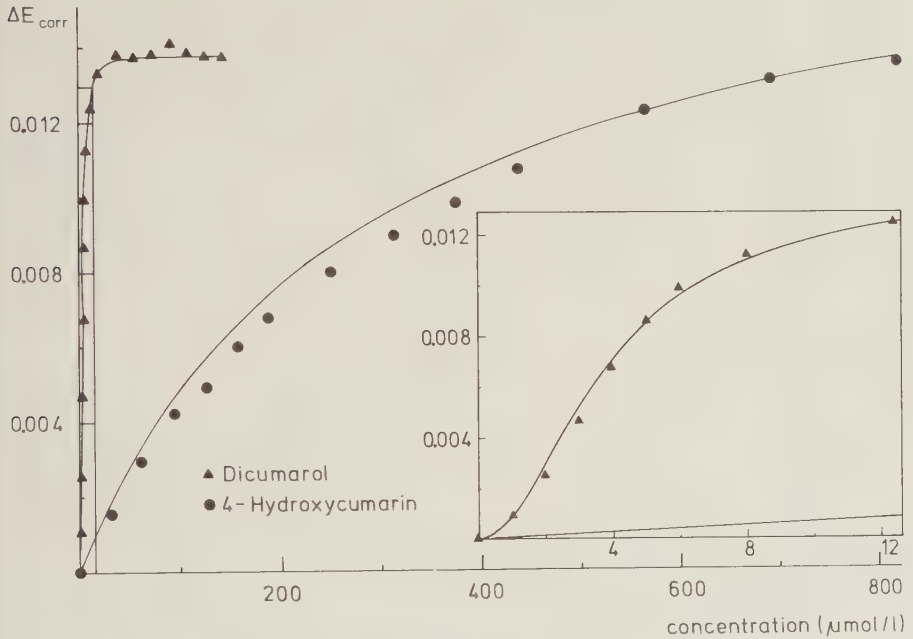
Abb.27 4-Hydroxycumarin

Dicumarol



nach WINDHOLZ (1976)

Abb.28 Inhibierung der Bindung von NPA (10 μM) an HSA (2,3 μM) durch 4-Hydroxycumarin und Dicumarol



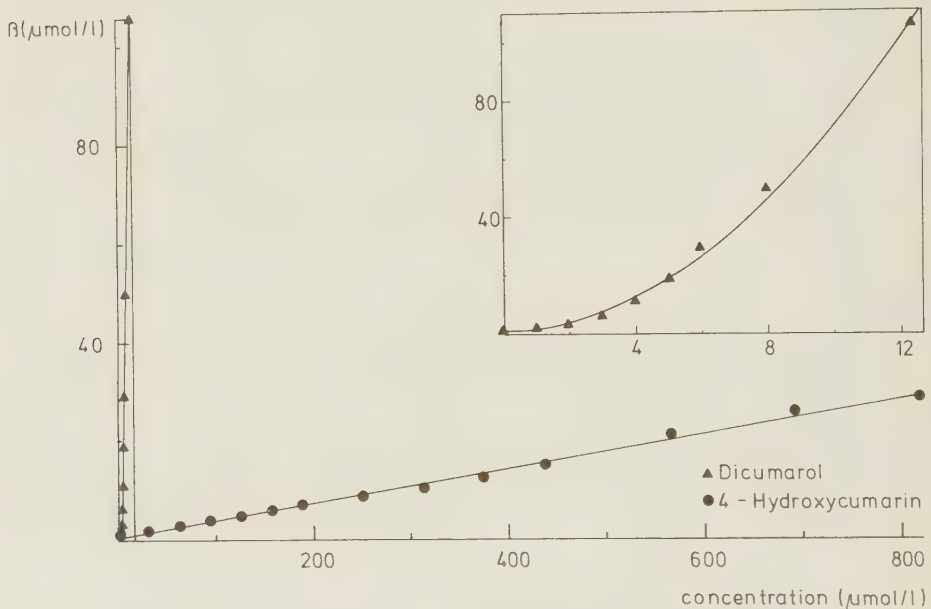
In der Abszisse sind die totalen Konzentrationen aufgetragen. Die eingezeichnete Kurve für 4-Hydroxycumarin ist mit der Assoziationskonstanten errechnet, die aus der modifizierten Dixon-Auftragung stammt. Die Berechnung der für Dicumarol in der Ausschittsvergrößerung eingezeichneten Kurve ist im Text beschrieben.

200 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7,4; 37 °C

Die NPA-Verdrängung durch Dicumarol zeigt im Gegensatz zu 4-Hydroxycumarin und allen anderen untersuchten Substanzen einen sigmoidalen Kurvenverlauf (Abb.28). Während in der modifizierten Dixon-Auftragung alle Meßpunkte für 4-Hydroxycumarin auf einer Geraden liegen ($r = 0,997$) (ΔE_A wurde erst durch Zugabe von Dicumarol erreicht), beschreiben die Punkte für Dicumarol eine Parabel (Abb.29). Daher ergibt bis zu

einer NPA-Ablösung von 92 % die Auftragung von β gegen das Quadrat der totalen Dicumarolkonzentration (Abb.30) eine lineare Beziehung ($r = 0,998$).

Abb.29 modifizierte Dixon-Auftragung der Meßreihen von Abb.28

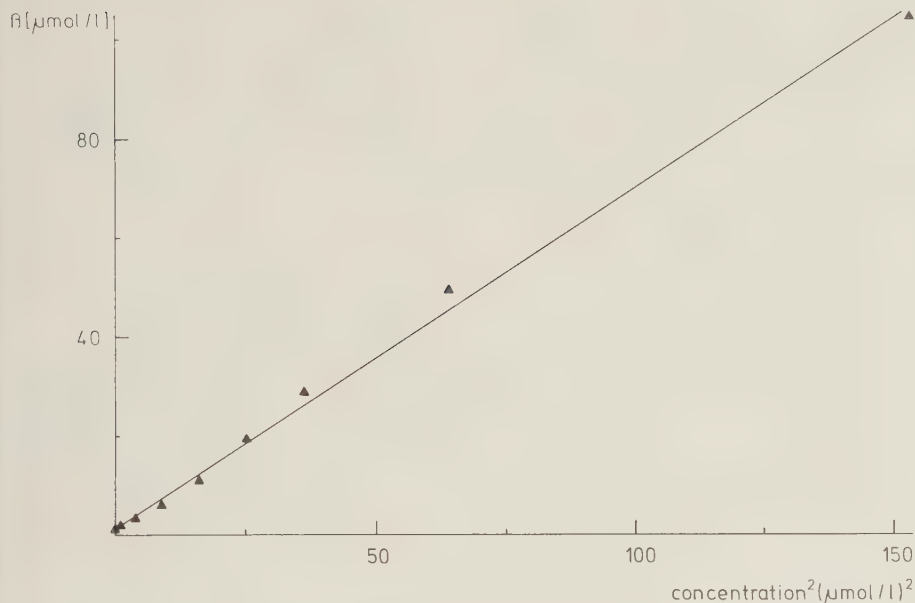


Die Berechnung der für Dicumarol eingezeichneten Kurve ist im Text beschrieben.

Die in Abb.29 eingezeichnete Kurve für Dicumarol wurde mit Hilfe der Gleichung der Regressionsgeraden von Abb.30 $\beta = 0,693 \mu\text{M}^{-1} \times \text{Dicumarol}^2 + 1,51 \mu\text{M}$ errechnet, indem statt der totalen Dicumarolkonzentration deren Quadrat eingesetzt wurde.

Die in der Ausschnittsvergrößerung von Abb.28 durchgezeichnete Dicumarolkurve wurde mit Hilfe des Quotienten aus $K_{D,NPA}$ und dem Geradenanstieg in Abb.30 ermittelt, ähnlich

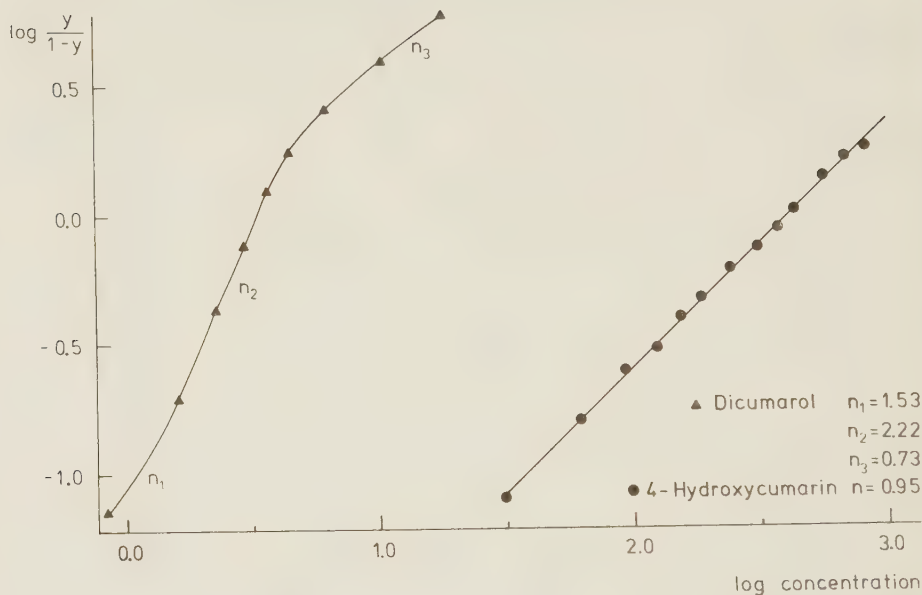
Abb.30 Auftragung von β in Abhängigkeit von dem Quadrat der totalen Konzentration von Dicumarol



der Bestimmung von $K_{D,I}$ aus einer modifizierten Dixon-Auftragung. Dieser Quotient wurde bei der Errechnung der Kurve als $K_{D,I}$ eingesetzt, wobei aber statt der totalen Dicumarolkonzentration auch hier deren Quadrat verwendet wurde.

Die mathematische Beschreibung der Interaktionen zwischen Dicumarol, NPA und der beobachteten Bindungsstelle mit dem Modell der kompetitiven Inhibierung der NPA-Bindung durch Dicumarol, wobei die Dicumarolkonzentration in der 2. Potenz eingeht, zeigt eine auffallend gute Übereinstimmung mit den Meßwerten, wie Abb.29 und besonders Abb.28 belegen. Aus der modifizierten Dixon-Auftragung (Abb.29) folgt für 4-Hydroxycumarin: $K_A = 3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Abb.31 Hill-Auftragung der Meßreihen von Abb.28



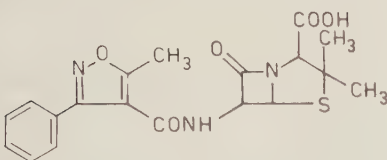
Y ist das molare Verhältnis von an der untersuchten Stelle gebundenen zu dort maximal gebundenen Substanz. In der Abszisse ist für 4-Hydroxycumarin die totale Konzentration aufgetragen und für Dicumarol die Differenz aus der Gesamtkonzentration und der an der Stelle gebundenen Konzentration. n ist die Steigung.

Aus der Hill-Auftragung (Abb.31) resultiert für 4-Hydroxycumarin $K_A = 2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ und für Dicumarol $K_A = 3,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

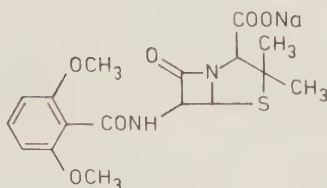
Während in der Hill-Auftragung die Meßpunkte für 4-Hydroxycumarin auf einer Geraden liegen ($r = 0,9994$), weicht die Kurvenform für Dicumarol von denen für alle anderen untersuchten Substanzen ab.

4.2.7 Penicilline

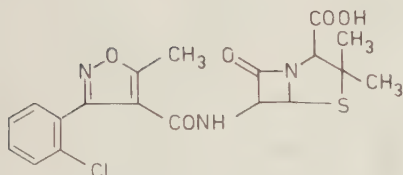
Abb.32 Oxacillin



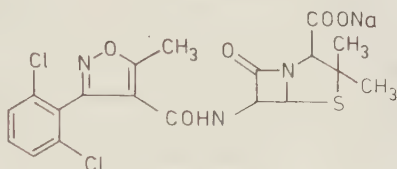
Methicillin



Cloxacillin



Dicloxacillin



(WINDHOLZ, 1976)

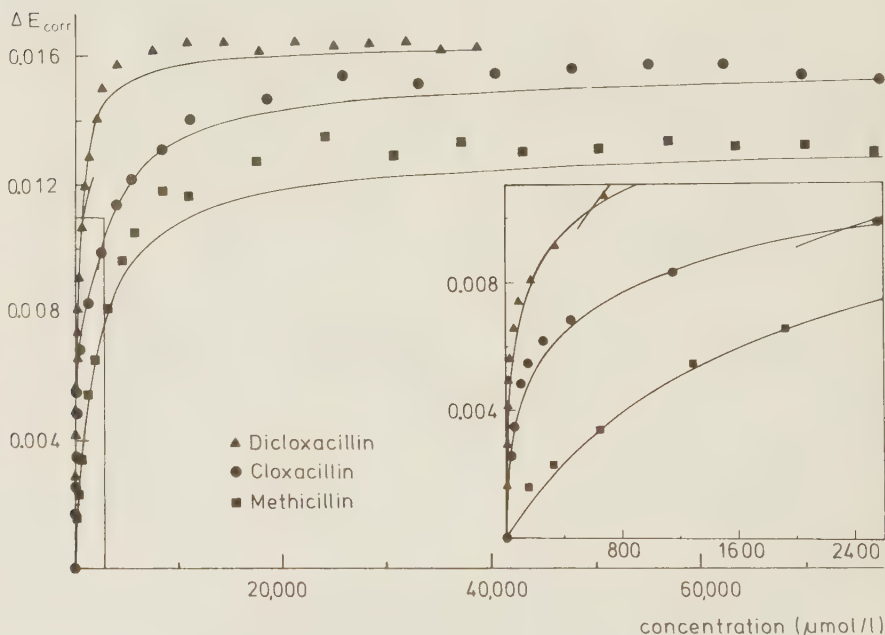
Oxacillin, Methicillin, Cloxacillin und Dicloxacillin vermindern die NPA-Bindung an der untersuchten Stelle (Abb.33 und Abb.8), jedoch, wie Abb.34 zeigt, auf zweierlei Art.

Die linearen Beziehungen zwischen β und den Konzentrationen von Oxacillin bis zu einer NPA-Verdrängung von 90 % ($r = 0,9987$) und Methicillin bis 62 % ($r = 0,9994$) lassen auf eine kompetitive Hemmung der NPA-Bindung durch diese Substanzen schließen, wobei dieser Mechanismus bei Oxacillin offensichtlich noch durch einen zweiten Prozeß überlagert wird (Abb.9). Aus diesen Auftragungen folgt für Methicillin $K_A = 4,8 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ und für Oxacillin $K_A = 1,2 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$.

Die Verdrängungskurven für Cloxacillin und Dicloxacillin lassen zwei Anteile erkennen:

Bei kleinen Konzentrationen beschreiben die Punkte in der modifizierten Dixon-Auftragung (Abb.34) den Verlauf einer

Abb.33 Inhibierung der Bindung von NPA (10 μM) an HSA (2,3 μM) durch Methicillin, Cloxacillin und Dicloxacillin



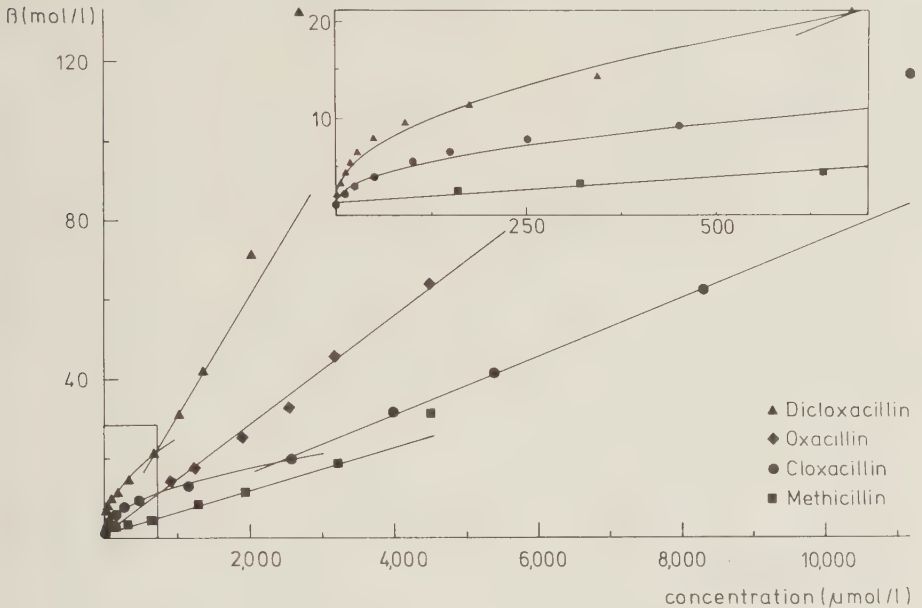
Die durchgezogene Kurve für Methicillin ist mit der Assoziationskonstanten errechnet, die aus der modifizierten Dixon-Auftragung stammt. Die Berechnung der eingezeichneten Kurven für Cloxacillin und Dicloxacillin ist im Text beschrieben.

50 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7,7; 37 °C

Quadratwurzelfunktion. Dies wird durch die Linearität in der Auftragung von β gegen die Quadratwurzel der Gesamtkonzentration für Cloxacillin bis zu einer NPA-Verdrängung von 64 % ($r=0,997$) und für Dicloxacillin bis 65 % ($r=0,993$) bestätigt (Abb.35).

In der modifizierten Dixon-Auftragung folgt ein linearer Abschnitt. Für Cloxacillin reicht er bis zu einer NPA-Verdrängung von 85 % und für Dicloxacillin bis 79 %. Errechnet

Abb.34 modifizierte Dixon-Auftragung der Meßreihen von Abb.33

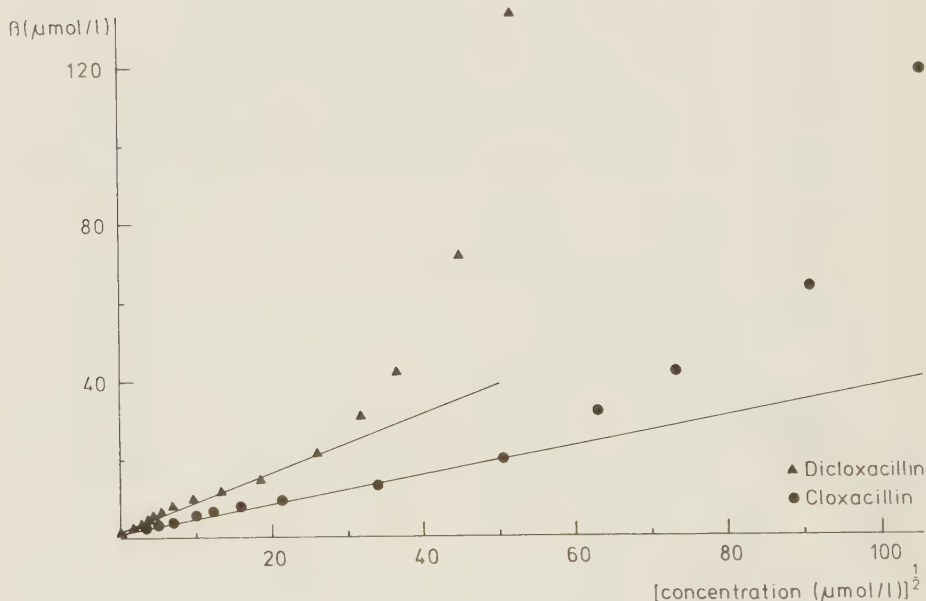


Zum Vergleich sind noch einige Werte für Oxacillin aus Abb.9 eingezeichnet.

man aus diesem linearen Teil Assoziationskonstanten, so ergibt sich für Cloxacillin $K_A = 6,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ und für Dicloxacillin $K_A = 2,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Diese Assoziationskonstanten entsprechen den Werten aus der Hill-Auftragung: Für Cloxacillin ist $K_A = 6,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, Dicloxacillin $K_A = 3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, Methicillin $K_A = 3,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ und für Oxacillin ist $K_A = 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

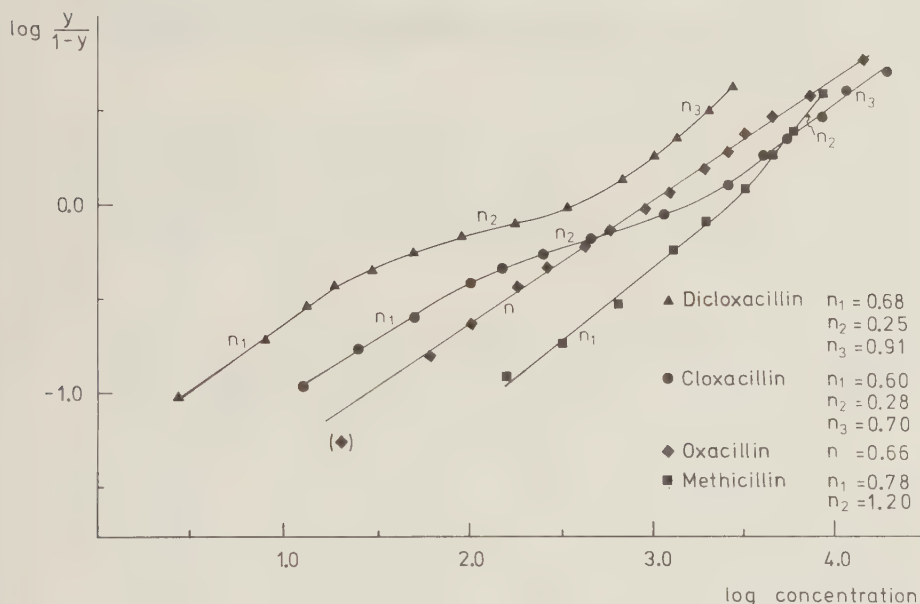
Die in Abb.34 eingezeichneten Kurven für den ersten Abschnitt der NPA-Verdrängung durch Cloxacillin und Dicloxacillin wurden mit Hilfe der Regressionsgeraden von Abb.35 errechnet, indem statt der totalen Konzentrationen deren Quadratwurzel eingesetzt wurde.

Abb.35 Auftragung von β in Abhängigkeit von der Quadratwurzel der totalen Konzentration von Cloxacillin und Dicloxacillin



Die in Abb.33 eingezeichneten Kurven für den ersten Abschnitt der NPA-Verdrängung durch die beiden Substanzen wurden mit Hilfe der Quotienten aus $K_{D,NPA}$ und den Geradensteigungen in Abb.35 ermittelt, wiederum ähnlich der Bestimmung von $K_{D,I}$ aus einer modifizierten Dixon-Auftragung. Diese Quotienten wurden bei der Errechnung der Kurven als $K_{D,I}$ eingesetzt, wobei aber statt der totalen Konzentrationen deren Quadratwurzel verwendet wurde. Der zweite Teil dieser Kurven wurde mit den Assoziationskonstanten errechnet, die aus den linearen Anteilen der modifizierten Dixon-Auftragung stammen.

Abb.36 Hill-Auftragung der Meßreihen von Abb.33 und Abb.8



Y ist das molare Verhältnis von an der untersuchten Stelle gebundenen zu dort maximal gebundenen Substanz. In der Abszisse ist die Gesamtkonzentration aufgetragen. n ist die Steigung.

Um die Nahtstellen zwischen diesen mathematisch unterschiedlich zu beschreibenden Kurvenanteilen zu kennzeichnen, wurden in Abb.33 und Abb.34 die errechneten Kurven geringfügig über ihre zugehörigen Definitionsbereiche hinaus fortgesetzt.

4.3 NPA-Bindung an modifiziertem HSA

4.3.1 NPA-Bindung an durch Nitrophenylsulphenylchlorid (NPS) modifiziertem HSA

NPS bindet kovalent in Proteinen an Tryptophan (BOCCU et al., 1970). Unter den hier verwendeten Reaktionsbedingungen beobachteten FEHSKE et al. (1979a) eine spezifische Modifikation des einzigen Tryptophanrestes im HSA, bei der durch Aminosäureanalyse kein unverändertes Tryptophan zu entdecken war.

Es wurde bereits in Abb.5 gezeigt, daß NPA-HSA unter Beibehaltung seines Einflusses auf die NPA-Absorption NPA bindet. Der Auftragung von α gegen NPA'_b (Abb.6) zufolge beträgt für die Bindung von NPA an NPS-HSA $K_{A,NPA} = 4,86 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Die Veränderung an Trp 214 führt somit zu einer Minderung der Assoziationskonstanten um 46 %.

Da die Bindungskonstante für Warfarin durch NPS-Modifikation des HSA um 70 % gesenkt wird (FEHSKE et al., 1979b), sehe ich in dieser Beobachtung, zusammen mit der NPA-Verdrängung durch Phenylbutazone, einen deutlichen Hinweis auf die Identität der NPA-Bindungsstelle mit der Stelle I, die diesen Versuchen nach in der Nähe von Trp 214 zu vermuten ist.

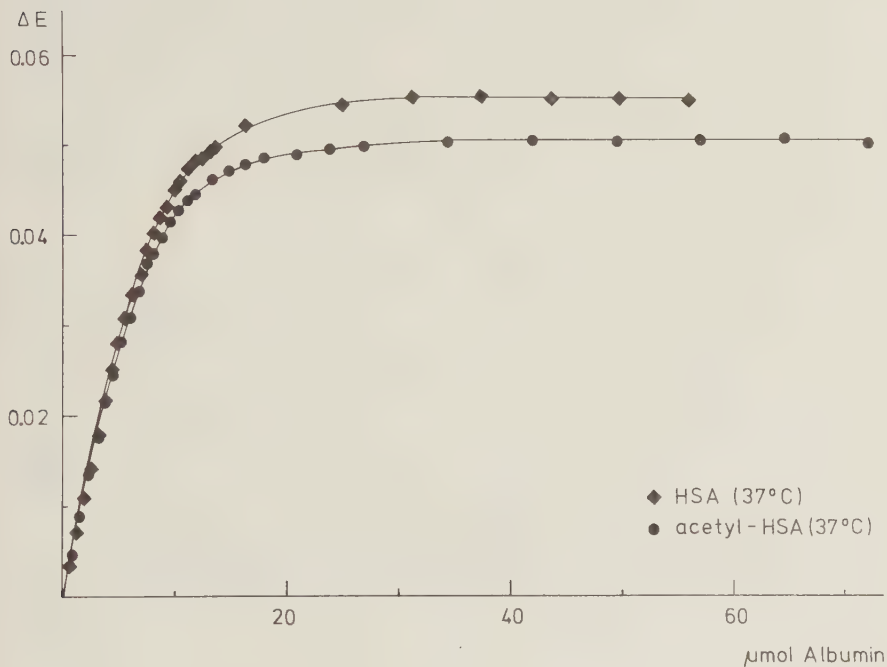
4.3.2 NPA-Bindung an durch Acetylsalicylsäure modifiziertem HSA

Acetylsalicylsäure acetyliert Lys 199 im HSA (WALKER, 1976). Nach Abb.37 bindet das acetylierte HSA unter Beibehaltung seines Einflusses auf die NPA-Absorption NPA, wobei aus Abb.38 $K_{A,NPA} = 8,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ resultiert.

Dieser Wert liegt knapp 6 % unter der Assoziationskonstanten für die Bindung von NPA an unverändertem HSA bei gleicher Temperatur.

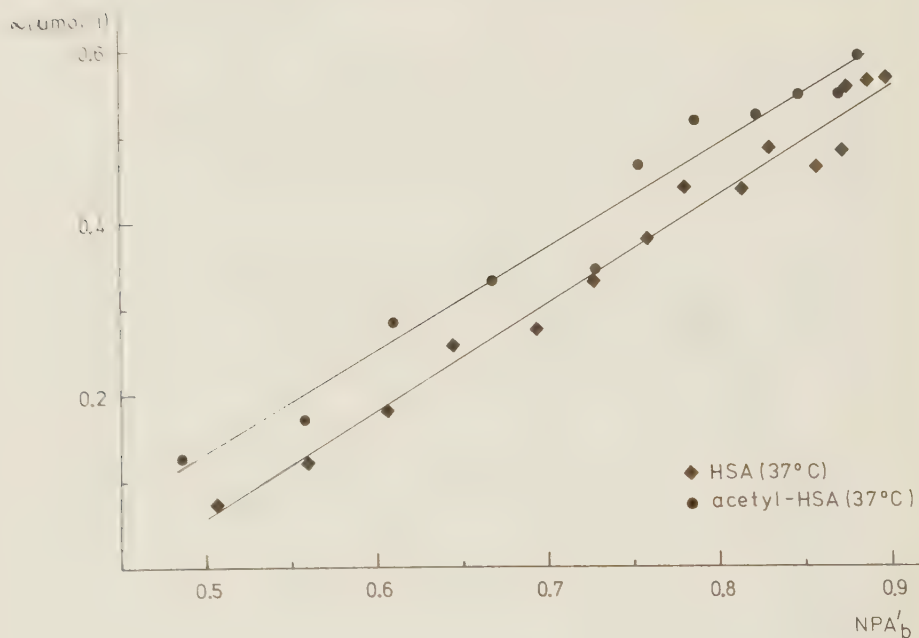
Da diese Abweichung sicherlich innerhalb der Fehlergrenzen der Meßmethode liegt, verändert die Acetylierung von Lys 199 die Affinität von NPA zu HSA nicht signifikant.

Abb.37 Bindung von NPA (10,3 μ M) an HSA sowie an durch Acetylsalicylsäure modifiziertes HSA



Die zum Vergleich eingezeichnete Bindungskurve an unverändertem HSA ist mit der aus Abb.5 identisch.
50 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7,4

Abb.38 Vergleich der Bindung von NPA an HSA mit der Bindung von NPA an durch Acetylsalicylsäure an der Stelle Lys 199 modifiziertem HSA



NPA'_b ist das Verhältnis von an der untersuchten Stelle gebundenem zu dort maximal gebundenem NPA. Der Anstieg der Regressionsgeraden ist gleich der Dissoziationskonstanten (siehe Gleichung 8).

4.4 Pepsin-Spaltung von mit ^3H -NPA markiertem NPA

Durch Photoaffinitätsmarkierung mit ^3H -NPA (HANSTEIN, 1979), anschließender Pepsin-Spaltung und Identifikation eines radioaktiven Albuminbruchstückes soll die bisher untersuchte Bindungsstelle für NPA innerhalb der Primärstrukturbereiche von Albumin lokalisiert werden.

Dabei liegt der Photoaffinitätsmarkierung die Idee zugrunde, daß sich zuerst ein Gleichgewicht bei der reversiblen NPA-Bindung durch hydrophobe Wechselwirkung oder Wasserstoffbrückenbildung an der untersuchten Albuminstelle einstellt und im zweiten Schritt durch Lichtbestrahlung ein aktivierter Zustand erzeugt wird, in dem NPA in der Gegend kovalent bindet, wo es sich gerade befindet.

In diesem Abschnitt wird, wie bei fast allen Autoren, die sich mit enzymatischer Spaltung von Albumin befassen, mit

Abb.39 Vergleich der Primärstrukturen von HSA und BSA in der Nähe der vermuteten Lokalisation der NPA-Stelle

	190		195		200
HSA:	Lys-Ala-Ser-Ser-Ala-Lys-Gln-Arg-Leu-Lys-Cys-Ala-Ser-				
BSA:	Leu-Thr-Ser-Ser-Ala-Arg-Gln-Arg-Leu-Arg-Cys-Ala-Ser-				
	190		195		200
	205		210		215
HSA:	Leu-Gln-Lys-Phe-Gly-Glu-Arg-Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-				
BSA:	Ile-Gln-Lys-Phe-Gly-Gln-Arg-Ala-Leu-Lys-Ala-Trp-Ser-				
	205		210		
	220				
HSA:	Val-Ala-Arg-Leu-Ser				
BSA:	Val-Ala-Arg-Leu-Ser				
	215				

Die HSA-Sequenz stammt von MELOUN et al. (1975), die BSA-Sequenz von BROWN (1976).

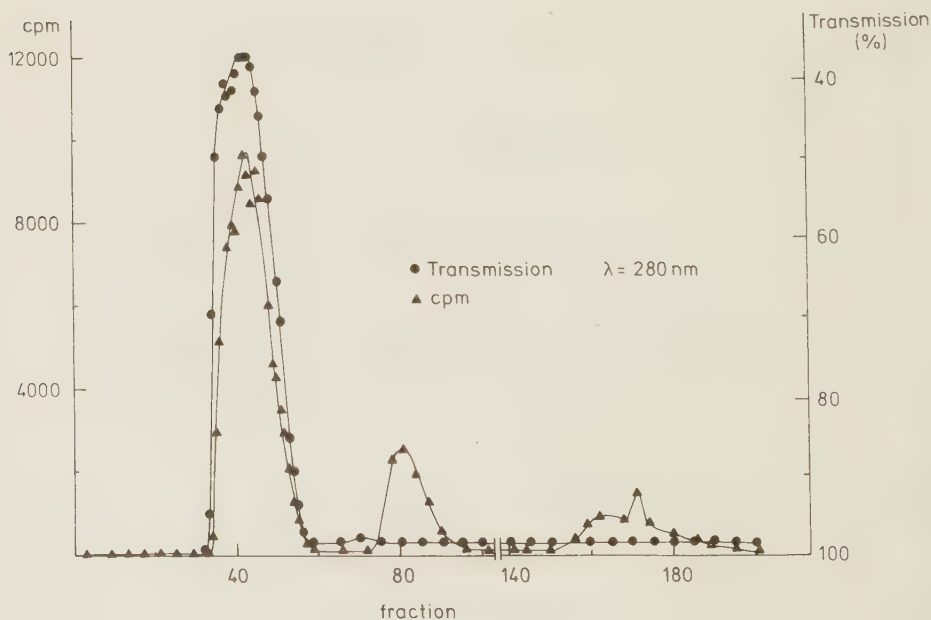
≈ kennzeichnet konservative Substitutionen;

= kennzeichnet identische Primärstrukturen

BSA gearbeitet, zumal die Aminosäuren in der Primärstruktur von HSA und BSA zu ungefähr 80 % übereinstimmen (BROWN, 1976).

Der Vergleich der Primärstrukturen eines 31 Aminosäuren langen Stückes aus BSA mit dem entsprechenden aus HSA, das die durch Acetylsalicylsäure und NPS modifizierbaren Aminosäuren enthält, zeigt, daß auch in der Umgebung der vermuteten Lokalisation der NPA-Bindungsstelle (d.h. in der Nähe von Trp 214) die Primärstruktur zu über 77 % identisch ist, und, werden die konservativen Substitutionen hinzugezählt, sogar eine Analogie von 90 % besteht (Abb.39).

Abb.40 Abtrennung von ^3H -NPA-Photolyseprodukten und nicht reagiertem ^3H -NPA von mit ^3H -NPA markiertem BSA



3,5 ml eines typischen Ansatzes zur BSA-Markierung wurden zusammen mit Dextran Blau auf eine mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,9) äquilibrierte Sephadex G-25 Säule (h=54 cm; r=1 cm) gegeben. Die Fraktionen

(3 ml) wurden bei Raumtemperatur mit demselben Puffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 36 ml/h eluiert, wobei der erste Peak von markiertem BSA gebildet wird und die folgenden Maxima im Radioaktivitätsprofil von ^3H -NPA und dessen Photolyseprodukten stammen mögen.

Um Dimerisation zu vermindern (PETERS und FELDHOFF, 1975a), wurde an die freie Thiolgruppe des BSA (Abb.1) ein halb-Cystinrest gekoppelt.

Weil nur die bisher untersuchte primäre NPA-Bindungsstelle markiert werden sollte, und nicht noch mögliche sekundäre Stellen, war halb-cystinyl BSA im Ansatz für die photochemische Markierung in 3fachem molaren Überschuß zu ^3H -NPA.

Es folgte eine Filtration über eine Sephadex G-25 Säule, um nicht reagiertes und durch Photolyse entstandene NPA-Produkte abzusondern, die HANSTEIN et al. (1979) durch Dünnschichtchromatographie in mindestens drei verschiedene Substanzen auftrennen konnten (Abb.40).

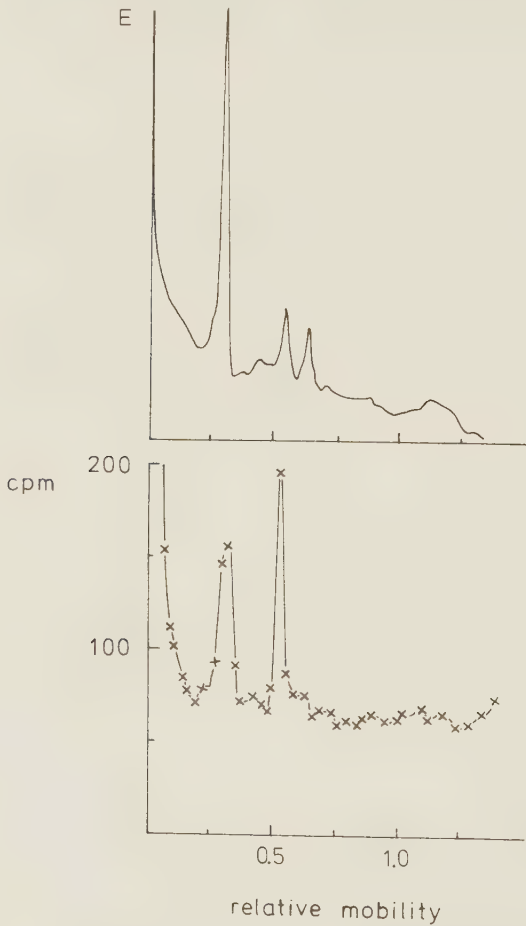
Mit Hilfe der bekannten spezifischen Radioaktivität von ^3H -NPA und dem durch einen Standard bestimmten Faktor für die Ausbeute in der Radioaktivitätsmessung konnte in dem kovalent markierten Albumin ein molares BSA / HSA Verhältnis von 5,3 ermittelt werden.

Das Material einer 20 Minuten dauernden BSA-Spaltung mit Pepsin nach FELDHOFF und PETERS (1975b) wurde einer Gelelektrophorese mit Weber/Osborn-Gelen unterzogen. Das Densitogramm der gefärbten Gele mit drei deutlichen Maxima ist in Abb.41 dem Radioaktivitätsprofil gegenübergestellt.

Nach FELDHOFF und PETERS (1975b) entspricht im Densitogramm der erste hohe Peak ungespaltenem Albumin, das zweite Maximum dem Bruchstück P-B, das die Aminosäuren 1 bis 306 enthält, und der dritte Peak gibt die Lage vom Fragment P-A wieder, das von der Aminosäure 307 bis zur C-terminalen Aminosäure 581 reicht.

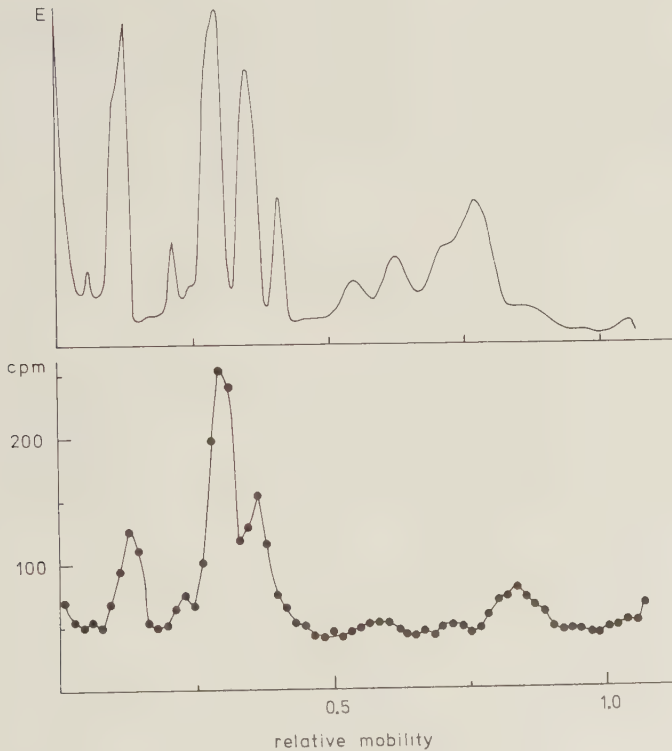
Das Radioaktivitätsprofil zeigt einerseits erwartungsgemäß eine ^3H -NPA-Markierung des Albumin andererseits für die

Abb.41 Bruchstücke nach einer 20 Minuten dauernden Pepsin-Spaltung von BSA mit ^3H -NPA markierter Bindungsstelle



Gegenübergestellt sind Densitogramm und Radioaktivitätsprofil von Weber/Osborn-Gelen, auf die das Produkt einer 20 Minuten dauernden Spaltung von BSA durch Pepsin aufgetragen wurde (pro Gel etwa 15 μg Protein).

Abb.42 Bruchstücke nach einer 120 Minuten dauernden Pepsin-Spaltung von BSA mit ^3H -NPA markierter Bindungsstelle



Gegenübergestellt sind Densitogramm und Radioaktivitätsprofil von Weber/Osborn-Gelen, auf die das Produkt einer 120 Minuten dauernden Spaltung von BSA durch Pepsin aufgetragen wurde (pro Gel etwa 20 μg Protein).

beiden Bruchstücke deutlich eine ausschließliche Markierung von P-B.

Somit liegt die untersuchte Bindungsstelle des Albumin in der aminoterminalen Hälfte seiner Primärstruktur.

Da die beiden Autoren eine deutlich höhere Ausbeute von P-B und P-A in ihrer 20 minütigen Spaltung erzielten, wurde unter denselben Verhältnissen eine Spaltung 120 Minuten lang durchgeführt. Abb.42 zeigt außer einer Bestätigung der Ergebnisse aus Abb.41, daß neben den vermehrt aufgetretenen P-B und P-A weitere Bruchstücke entstanden.

5 DISKUSSION

5.1 Bindung von NPA an HSA

5.1.1 Meßverfahren

NPA bindet als Anion an eine Bindungsstelle des HSA unter Verschiebung seines Absorptionsspektrums im Bereich sichtbaren Lichtes (Abb.3), wobei eine geringfügige Beeinflussung des Spektrums durch mögliche weitere NPA-Bindungsstellen am HSA mit deutlich geringerer Affinität nicht ausgeschlossen ist. Dieses Absorptionsverhalten wurde für eine photometrische Bestimmung der betreffenden Assoziationskonstanten benutzt (Abb.5 und 6): $K_A = 9,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ bei 37°C .

In den Abb.6 und 38 verlaufen die Regressionsgeraden nicht, wie nach Gleichung 8 zu erwarten ist, durch den Ursprungspunkt des Koordinatensystems, sondern weisen einen negativen Ordinatenabschnitt auf. Die Ursache mag einerseits in der Existenz weiterer, mit dieser Methode nicht zu beobachtenden NPA-Bindungsstellen liegen, die das Bindungsgleichgewicht an der untersuchten Stelle beeinflussen, wenn auch aufgrund ihrer um Größenordnungen kleineren Affinität nur geringfügig. Andererseits hat die in 4.1.2.1 getroffene Abschätzung, daß für die ersten Punkte einer Meßreihe die Bindungsstellen an allen HSA-Molekülen mit NPA besetzt ist, ein um ungefähr 10 % zu geringes $\Delta \epsilon'$ zur Folge. Nach den Gleichungen 9 und 7 wird daher α mit einem etwas zu kleinen Wert versehen.

Die Gültigkeit der mit dieser Methode gemessenen Assoziationskonstanten, die ja nicht aus dem Ordinatenabschnitt sondern dem Anstieg der Regressionsgeraden errechnet wird, belegen neben die in Tabelle 2 aufgeführten Vergleiche von Literaturwerten mit denen aus dieser Konstanten abgeleiteten Affinitäten der Inhibitoren der Vergleich mit 2,4-Dinitrophenol: $K_A = 9,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ bei 30°C , pH 7,4 (TABACHNIK et al, 1970). HANSTEIN et al.(1979) ermittelten für die Bindung von

NPA an BSA bei 30 °C $K_A = 1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Die Möglichkeit, photometrisch das an der beobachteten Stelle gebundene NPA zu messen, wurde benutzt, um Interaktionen anderer Substanzen mit dieser Stelle zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde eine modifizierte Dixon-Auftragung entwickelt.

In den meisten modifizierten Dixon-Auftragungen resultieren für die Punkte je nach Meßreihe bis zu einer NPA-Verdrängung von 50 % bis 90 % Korrelationskoeffizienten größer als 0,98. Erst dann weichen die Meßpunkte von einer nach Gleichung 17 zu erwartenden linearen Beziehung ab. Diese Auftragung erwies sich daher als besonders gut geeignet für die Beschreibung des ersten Teils der NPA-Verdrängung.

Es ist nicht auszuschließen, daß auch hier NPA-Bindung an einer möglichen sekundären Stelle einen, wenn auch nur geringen, Anteil zur Abweichung beisteuert, besonders nachdem im Bereich der Abweichung der größte Teil der primären NPA-Stelle durch den Inhibitor bereits geblockt ist.

Ich halte es für wahrscheinlicher, daß die wegen der in Kapitel 4.2.1.1.1 diskutierten unspezifischen Extinktionsänderungen erforderliche Korrektur der Meßwerte ΔE zu gering ausgefallen ist, so daß zu große ΔE_{corr} durch die Empfindlichkeit des Faktors $\Delta E_A - \Delta E_{\text{corr}}$ (Gleichung 18) gegenüber Fehlern von ΔE_{corr} gerade bei Annäherung zur Asymptoten die Abweichung von der Linearität bewirken. Auch die entsprechenden Hill-Auftragungen sprechen gegen ein "zweigeteiltes" Bindungsverhalten als Ursache dieser Abweichung, da sie fast über den gesamten meßbaren Bereich der Verdrängung von einer linearen Beziehung nicht abgehen.

Die Vor- und Nachteile des hier beschriebenen photometrischen Meßverfahrens zeigt ein Vergleich mit einigen aus der großen Zahl von in der Literatur angegebenen Methoden.

Das Verfahren, das zur Messung von Ligandenbindung die meiste Verwendung findet, ist die Gleichgewichtsdialyse. Zur Erreichung eines Konzentrationsgleichgewichtes für ein be-

stimmtes Verhältnis zwischen Ligand(en) und Albumin muß ungefähr 24 Stunden dialysiert werden, wobei Fehler durch Ligandenbindung am Dialysierbeutel auftreten können (CHOU et al., 1981). Die dann gemessene freie Konzentration der zumeist radioaktiv markierten Substanz ist das Resultat der Bindungen an alle für diese Substanz am HSA existierenden Ligandenstellen. Aus einer Anzahl dieser Meßpunkte wird rechnerisch meistens mit Hilfe der Scatchard-Auftragung (SCATCHARD, 1949) auf Klassen von Bindungsstellen etwa gleich großer Affinität geschlossen, wobei für eine Klasse neben der Anzahl der Stellen nur die in dieser Klasse durchschnittliche Assoziationskonstante ermittelt werden kann. Diese Methode beschreibt somit die Bindungsvorgänge am Albumin umfassend, während die Aussagen für eine bestimmte Ligandenstelle wegen der Mittelwertbildung innerhalb einer Klasse ungenau sein können.

Die Messung der Bindung oder kompetitiven Verdrängung von NPA zielt dahingegen von vornherein nur auf eine Ligandenstelle, da nur diese photometrisch beobachtet werden kann, wobei eine vollständige Meßreihe nicht länger als 2 Stunden dauert.

SJÖHOLM et al. (1979) immobilisieren HSA in sphärischen Mikropartikeln aus Polyacrylamid und messen durch Verdrängung von spezifischen Liganden die Bindung an die Stelle I, Stelle II und die Digitoxinstelle. Dabei bleibt die Frage, ob die Albuminkonformation und damit die Bindungsstellen durch die Immobilisierung nicht verändert wurde, und auch hier werden radioaktive Marker benötigt. Für Phenobarbital konnte eine Bindung am HSA nicht nachgewiesen werden. Den Ausführungen der Autoren und der in dieser Arbeit ermittelten Konstanten für die Phenobarbitalbindung an der NPA-Stelle nach liegt dies an der von SJÖHOLM et al. verwendeten Methode, die für Affinitäten in der Größenordnung der Phenobarbitalbindung zu unempfindlich ist.

Dieses zeigt, daß die Spannbreite der durch NPA-Verdrängung ermittelten Assoziationskonstanten relativ groß ist, zumal die noch geringere Affinität von Barbitol zutreffend abge-

geschätzt werden konnte (Tab.2, S.81).

Auch bei der von NAKANO et al. (1978, 1979 und 1980) durchgeführten Affinitätschromatographie, für die BSA über einen Arm aus 6 Kohlenstoffatomen an Agarose oder Sepharose 4B gekoppelt wurde, wird durch Scatchard-Auftragungen auf die durchschnittliche Affinität in einer Klasse von Bindungsstellen geschlossen. Probleme bereiten bindungsunspezifische Interaktionen potentieller Liganden mit der Gelmatrix und die Unsicherheit über den Einfluß der Kopplung auf die Bindungseigenschaften von Albumin.

Eine Meßmethode, die mit der hier ausgearbeiteten verwandt ist, deuten MAES et al. (1979) an. Sie beobachteten bei Bindung von Phenylbutazone an HSA eine Verschiebung des UV-Spektrum zu höheren Wellenlängen und konnten so den gebundenen Phenylbutazoneanteil bestimmen. Die Standardabweichung der auf diese Weise ermittelten Assoziationskonstanten wird von den Autoren jedoch als ziemlich hoch eingeschätzt, während die Unterschiede bei mehrfach ausgeführten Messungen mit NPA stets kleiner als 5 % ausfielen.

5.1.2 Bindungsmechanismus

Mit Blick auf Tab.2 gehört NPA ($K_A = 9,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) zu den Substanzen mit hoher Affinität zu HSA. Noch höhere Assoziationskonstanten in der Größenordnung von 10^8 M^{-1} sind für Bilirubin und langkettige Fettsäuren angegeben (BERDE et al., 1979).

Aus der Spektralverschiebung bei der NPA-Bindung an HSA läßt sich ein Energiebetrag von 2,7 kcal/mol (11,3 kJ/mol) abschätzen, um den die Elektronen im Chromophor im Grundzustand durch die Bindung stabilisiert werden. In der gleichen Größenordnung liegt der Wert für die Enthalpieänderung, der aus der Temperaturabhängigkeit der Assoziationskonstanten ermittelt wurde. Nach dieser Bestimmungsmethode trägt die Enthalpieänderung mit $\Delta H = -7,75 (\pm 0,05) \text{ kcal/mol}$ ($-32,4 \text{ kJ/mol}$)

und bei 37 °C die Entropieänderung mit $T \Delta S = 0,70(\pm 0,07)$ kcal/mol (2,9 kJ/mol) zur Änderung der Freien Energie bei. Diese Werte weisen auf Wasserstoffbrückenbindung und weniger auf hydrophobe Wechselwirkungen als Bindungsmechanismen hin.

Der Anteil der beiden Energiekomponenten zur Änderung der Freien Energie ist von Ligand zu Ligand unterschiedlich. So beträgt für die Bindung von Ibuprofen an HSA $\Delta H = -7,06$ kcal/mol und $T \Delta S = 2,08$ kcal/mol bei 37 °C (WHITLAM et al., 1979), für Warfarin $\Delta H = -3,48$ kcal/mol und $T \Delta S = 3,41$ kcal/mol bei 37 °C (O'REILLY, 1973). Bei Phenylbutazone ($\Delta H = +3,0$ kcal/mol, $T \Delta S = 11,4$ kcal/mol bei 37 °C; MAES et al., 1979) und Fettsäuren (BERDE et al., 1979) sind die Bindungen an HSA hauptsächlich Entropie-getrieben.

5.1.3 Lokalisierung den NPA-Bindungsstelle

5.1.3.1 Lokalisierung durch Phenylbutazone

Die Verdrängung des NPA von der beobachteten Bindungsstelle durch Phenylbutazone läßt sich weitgehend mit einem Modell beschreiben, das auf kompetitiver Bindung beider Substanzen an derselben Ligandenstelle des HSA basiert. Die Übereinstimmung der nach diesem Modell errechneten Assoziationskonstanten für den Komplex Phenylbutazone-HSA mit Werten anderer Autoren, die nicht auf Verdrängung eines anderen Liganden beruhen sondern direkt gemessen wurden (Tab.2), ist ein weiteres Indiz für die Identität der Phenylbutazone- und der beobachteten NPA-Bindungsstelle.

Während viele Autoren (SUDLOW et al., 1976; FEHSKE et al., 1981 und 1982; MEANS et al., 1982 und ausführlich SOLOMON et al., 1968) Phenylbutazone als Leitliganden der Warfarinstelle (=Stelle I) bezeichnen, und somit NPA ebenfalls an der

Stelle I bindet, vertreten MADSEN und TEARNE (1980) eine abweichende Meinung.

Sie beobachteten bei zunehmender Phenylbutazonekonzentration eine schwindende Warfarinbindung an HSA, die jedoch ab einer bestimmten Phenylbutazonekonzentration nicht weiter abnahm. Daraus schlossen sie, daß der Mechanismus hierfür eine allosterische Hemmung sein müsse, da bei Konkurrenz um dieselbe Stelle die Warfarinbindung bei steigender Phenylbutazonekonzentration auch weiterhin hätte abnehmen müssen.

Dieses Kriterium wäre jedoch nur richtig, wenn Warfarin nur eine Bindungsstelle am Albumin besäße. CHAKRABARTI (1978) beschreibt jedoch noch sekundäre Warfarinstellen mit $K_A = 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Für die verbliebene, durch Phenylbutazone nicht weiter zu unterdrückende Warfarinbindung kann man aus von MADSEN und TEARNE angegebenen Meßdaten¹ eine Assoziationskonstante von $K_A = 1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ abschätzen. Da ferner die apparente Assoziationskonstante für die primäre Warfarinbindung bei der höchsten von ihnen verwendeten Phenylbutazonekonzentration mit $K_A = 6,7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ zu veranschlagen ist,² beobachten sie nach einer ausreichend hohen Inhibierung der ersten Warfarinbindungsstelle offensichtlich die durch Phenylbutazone nicht beeinflusste sekundäre Warfarinbindung, und ihre Schlußfolgerung bezüglich des Hemmungsmechanismus ist somit nicht zwingend.

¹ In Anwesenheit von 10^{-4} M wie auch $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ Phenylbutazone sowie 10^{-6} M HSA beträgt der Logarithmus der freien Warfarinkonzentration $-4,6$ bei $0,25 \text{ mol}$ gebundenem Warfarin pro mol HSA.

² In die Beziehung $K'_{D, \text{Warf}} = K_{D, \text{Warf}} (1 + I/K_{D, \text{Phenbut.}})$ wurde eingesetzt: $K_{D, \text{Warf}} = 3,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ (CHAKRABARTI, 1978), $I = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ Phenylbutazone, $K_{D, \text{Phenbut.}} = 10^{-6} \text{ M}$.

Mit der Zuordnung von NPA zur Stelle I ist auch in Übereinstimmung zu bringen, daß Ouabain (=Strophantin G), das seiner strukturellen Verwandtschaft nach wohl an der Digitoxinstelle bindet, NPA in den verwendeten Konzentrationen nicht vom HSA verdrängt (2,3 μM HSA; 10 μM NPA; 0-3220 μM Ouabain).

5.1.3.2 Lokalisierung durch HSA-Modifikation

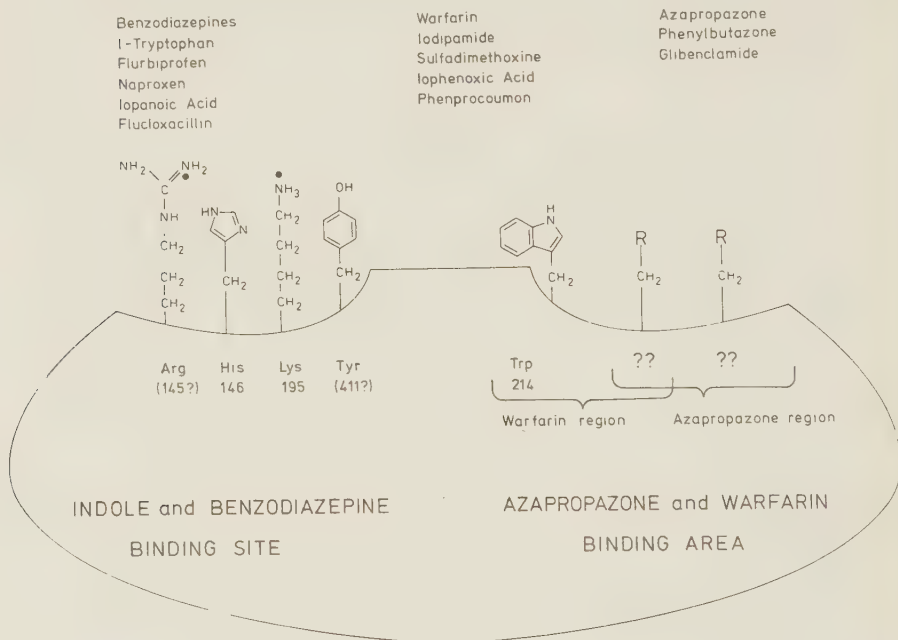
In Abb.5 und 37 stimmen für die jeweils eingezeichneten Meßreihen die Asymptoten bei hohen HSA-Konzentrationen nicht überein. Als Ursachen wären denkbar eine Blockade sekundärer NPA-Stellen durch die Modifikation oder ein abgeändertes Absorptionsspektrum für an modifiziertes HSA gebundenes NPA. Da jedoch bei der Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der NPA-Bindung ähnlich große Unterschiede auftraten, halte ich Abweichungen in den totalen NPA-Konzentrationen für wahrscheinlicher.

Obwohl die Steigungen der Regressionsgeraden in Abb.38 nahezu gleich sind, und damit auch die Affinitäten von NPA zu HSA beziehungsweise acetyl-HSA, fallen die Geraden nicht, wie nach Gleichung 8 zu erwarten, aufeinander. Die Ursache mag die Blockade einer sekundären NPA-Bindungsstelle sein.

Neben der kompetitiven Verdrängung von NPA durch Phenylbutazone, einem Leitliganden der Stelle I, bestätigt die Modifizierung der Aminosäure 214 in HSA mit NPS die Möglichkeit, daß die beobachtete NPA-Bindungsstelle mit der Warfarin-stelle identisch ist. Diese Modifikation vermindert nämlich die Assoziationskonstanten für NPA um 46 % und für Warfarin um 70 % (FEHSKE et al., 1979b).

FEHSKE et al.(1982) berichteten, daß bei einer Gruppe von Liganden der Stelle I mit Azapropazone als typischem Vertreter die Assoziationskonstanten durch Modifikation von Trp 214 nicht beeinflußt werden. Um diesen Widerspruch aufzulösen, entwarfen sie das Modell einer Azapropazone- und einer Trp 214 enthaltenden Warfarinbindungsstelle, die sich über-

Abb.43 Modell der beiden wichtigsten Bindungsstellen am HSA einschließlich typischer Liganden und beteiligter Aminosäuren



Diese Zeichnung stammt aus der Veröffentlichung von FEHSKE et al.(1982). Die Nummerierung der Aminosäuren wurde mit der von MELOUN et al.(1975) in Übereinstimmung gebracht.

lappen und so statt einer Bindungsstelle ein gemeinsames Bindungsareal formen (Abb.43). Mit der Trennung der beiden Stellen erklären sie die unterschiedliche Reaktion auf die Veränderung von Trp 214, mit ihrer Überlappung die gegenseitige kompetitive Verdrängung der Liganden beider Gruppen.

In diesem Modell ist NPA der Ligandengruppe zuzuordnen, die an den Trp 214 enthaltenden Arealanteil bindet.

FEHSKE et al.(1981) zählen in ihrem Übersichtsartikel Lys 199 zur Stelle I oder vermuten diese Aminosäure zumindest in deren enger Nachbarschaft. Daher war die unveränderte Assoziationskonstante für die Bindung des Stelle I-spezifischen NPA an durch Acetylsalicylsäure an der Stelle Lys 199 acetyliertem HSA eine Überraschung. Nach Aufarbeitung der von ihnen angegebenen sowie weiterer Literatur stelle ich jedoch die These auf, daß Lys 199 zur Stelle II gehört, die gleich ist der Bindungsstelle für mittelkettige Fettsäuren.

KOH und MEANS (1979) konnten zeigen, daß durch die aliphatischen Monokarbonsäuren Nonan- und Decansäure im Verhältnis 1 mol HSA zu 1 mol Anion die Reaktion von p-Nitrophenylacetat mit HSA verhindert wird. Sie konnten ebenfalls eine, wenn auch mit abnehmender Kettenlänge schwächer werdende kompetitive Inhibierung dieser Reaktion durch Oktan-, Heptan-, Hexan-, Valerian- und Buttersäure feststellen. Die Identität dieser Bindungsstelle für mittelkettige Fettsäuren mit der Benzodiazepinstelle folgt aus der kompetitiven Inhibition der Reaktion zwischen p-Nitrophenylacetat und HSA durch die für die Stelle II spezifischen Substanzen Tryptophan¹ (KOH und MEANS, 1979) sowie Flufenaminsäure² (IKEDA et al., 1979) und Ibuprofen² (SOLLENNE und MEANS, 1979).

Zu demselben Schluß kommen LEE und McMENAMY (1980) durch ihre Untersuchungen mit dem die Bindungsstelle für mittelkettige Fettsäuren blockenden Affinitätsmarker N-bromoacetyl-n-decylamin. Sie konnten zusätzlich nachweisen, daß Lys 199 die mit dem Affinitätslabel markierte Aminosäure ist.

Aus diesem Grund zähle ich im Gegensatz zu FEHSKE et al. (1981) Lys 199 zur Benzodiazepinstelle. Dazu paßt auch, daß nach SJÖHOLM et al.(1979) Acetylsalicylsäure nicht nur War-

¹ Daß Tryptophan spezifisch an die Stelle II bindet, zeigten MÜLLER und WOLLERT (1975) sowie KRAGH-HANSEN(1983).

² Die spezifische Bindung an die Stelle II wiesen SUDLOW et al.(1976) nach.

farin sondern auch Diazepam verdrängen kann,¹ und die Affinität des an Stelle I bindenden NPA durch Acetylierung von Lys 199 nicht verändert wird.

Die folgenden Beobachtungen von CHIGNELL und STARKWEATHER (1971), die von FEHSKE et al. (1981) zur Absicherung ihrer Theorie aufgeführt wurden, lassen sich auch mit dieser Zuordnung von Lys 199 erklären. Die Affinität von Flufenaminsäure ist gegenüber durch Acetylsalicylsäure acetyliertem HSA erniedrigt, die von Phenylbutazone erhöht und die durch Bindung dieser Substanzen hervorgerufenen extrinsischen Cotton-Effekte verändert. Da Flufenaminsäure spezifisch an die Benzodiazepinstelle bindet (SUDLOW et al., 1976), stützt diese Beobachtung eher die von mir vertretene These, und eine erhöhte Affinität von Phenylbutazone zu HSA ist durch allosterische Mechanismen denkbar, zumal eine Beeinflussung der Konformation der Warfarinbindungsstelle von der Stelle II aus schon beschrieben wurde (SUDLOW et al., 1976).

5.1.3.3 Lokalisierung durch enzymatische Spaltung

Durch Photoaffinitätsmarkierung mit ³H-NPA und anschließender Pepsin-Spaltung von BSA konnte gezeigt werden, daß die NPA-Bindungsstelle (=Warfarinstelle) im Bereich der Doppelschleifen 1-5 liegt, während in dem Fragment, das die zweite Albuminhälfte darstellt, keine Markierung aufgespürt werden konnte.

Auch diese Beobachtung stützt die Theorie, daß in dieser Arbeit nur eine Bindungsstelle beobachtet wird, sowie die Lokalisierung durch NPS-Modifikation, da Trp 214 in Doppelschleife 4 liegt (Abb.1).

Zuerst eine Bindungsstelle durch einen Affinitätsmarker ko-

¹ Für Salicylsäure konnten MEANS et al. (1982) sogar aussagen, daß Stelle I und Stelle II zwei primäre Bindungsstellen fast gleicher Affinität zu Salicylsäure darstellen.

valent zu kennzeichnen und dann zu spalten, hat für die Zuordnung einer Bindungsstelle zur Primärstruktur eine höhere Validität als der von REED et al.(1975) beschrittene Weg, die unter Albuminfragmenten dasjenige herauszusuchen, welches für einen bestimmten Liganden die gleiche Affinität wie das native Albumin aufweist. Denn eine Änderung der Fragmentkonformation durch die Herausnahme aus dem Gesamtmolekül ist nicht ausgeschlossen, und Hinweise auf die Beteiligung voneinander getrennter Sequenzen aus der Primärstruktur an einer Bindungsstelle wurden schon in der Einleitung aufgeführt.

Eine weitergehende Spaltung bis zur Bestimmung der mit ^3H -NPA markierten Aminosäure(n) erscheint erfolgversprechend und sinnvoll, zumal die Zuordnung der Stelle I zur Primärstruktur des HSA im Gegensatz zur Stelle II noch in den Anfängen ist.

5.2 Liganden der Warfarinstelle

In Analogie zu den Überlegungen bezüglich der NPA-Verdrängung durch Phenylbutazone (Kapitel 5.1.3.1) kann konstatiert werden, daß alle in Tabelle 2 aufgeführten Substanzen kompetitiv zu NPA an der Stelle I binden.

Die Hill-Koeffizienten für die Bindungen der meisten Substanzen liegen zwischen 0,7 und 0,9. Der Hill-Koeffizient für die Bindung von Phenylbutazone ($n=0,84$) wurde durch den Wert von MAES et al.(1979) ($n=0,826$) bestätigt.

Einen Anstieg kleiner als 1 für den größten Teil einer Hill-Auftragung ist zu erwarten (HECK, 1971), wenn es bei dem käuflich erworbenen HSA intermolekular Unterschiede bei der NPA-Bindungsstelle gibt. Diese Differenzen können durch unvollständige Entfernung von Fettsäuren vom HSA entstanden sein, deren Fähigkeit zur Beeinflussung der Albuminkonformation schon erwähnt wurde. Ferner enthalten 20 % der Moleküle halb-Cystein und 5 % halb-Glutathion an die alleinstehende SH-Gruppe des Cys 34 (Abb.4) gebunden (PETERS, 1975). Überdies legt das Molekulargewicht für die erste Proteinbande der Gelelektrophorese des erworbenen HSA (Abb.44) die Existenz von Albumindimeren¹ nahe (10 %).

Eine Modellberechnung, die von der Annahme zweier gleich häufiger Albuminmoleküle mit $K_D = 2 \mu M$ beziehungsweise $K_D = 4 \mu M$ für eine Ligandenbindung ausgeht, ergibt einen Hill-Koeffizienten von 0,98, so daß die experimentell ermittelten Koeffizienten jedoch zum überwiegenden Teil nicht auf intermolekulare Unterschiede zurückgeführt werden können.

¹ Albumindimerisation wird verantwortlich gemacht für bei steigender Albuminkonzentration abnehmende Assoziationskonstanten (beobachtet von BOOBIS und CHIGNELL, 1979, BOWMER und LINDUP, 1978 sowie MUELLER und POTTER, 1981). So könnte bei zunehmender Dimerisation ein größerer Anteil von Bindungsstellen sterisch verändert oder verdeckt werden (BOWMER und LINDUP, 1978).

Tab.2 Liganden der Stelle I

	Puffer- konz. mM	K_A (m. Dixon) M^{-1}	K_A (Hill) M^{-1}	n	K_A anderer Au- toren M^{-1}	
Phenylbutazone	200	$9,6 \times 10^5$	$7,7 \times 10^5$	0,84	$8,2 \times 10^5$	(1)
					$5,1 \times 10^5$	(2)
					$8,0 \times 10^5$	(3)
Indomethacin	200	$4,7 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	0,97	$1,8 \times 10^5$	(4)
					$1,5 \times 10^5$	(5)
					$3,0 \times 10^5$	(6)
BARBITURATE						
Barbital	200	$\leq 2,5 \times 10^2$			$7,0 \times 10^2$	(7)
Phenobarbital	200	$1,1 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	1,14	$2,5 \times 10^3$	(7)
					$1,0 \times 10^3$	(8)
Hexobarbital	200	$5,0 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	0,89		
Thiopental	50	$2,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	1,02	$4,2 \times 10^4$	(7)
SULFONAMIDE						
Sulfisomidine	200	$3,4 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	0,91	$5,0 \times 10^3$	(9)
Sulfamethoxy- pyridazine	200	$9,3 \times 10^3$	$7,8 \times 10^3$	0,86		
Sulfisoxazole	200	$1,9 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	0,79	$3,7 \times 10^4$	(10)
					$1,8 \times 10^4$	(11)
SALICYLATE						
Salicylsäure	50	$1,8 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	0,84	$4,6 \times 10^5$	(12)
Salicylsäure $^{\pi}$	50	$3,5 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	0,87	$2,9 \times 10^5$	(13)
					$1,2 \times 10^5$	(8)
Acetyl- salicylsäure $^{\pi}$	50	$1,7 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	0,81	$2,8 \times 10^3$	(8)
CUMARIN-DERIVATE						
4-Hydroxy- cumarin	200	$3,1 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	0,95	$7,9 \times 10^4$	(14)
PENICILLINE						
Methicillin	50	$4,8 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$	0,78	$2,1 \times 10^4$	(15)
Oxacillin	50	$1,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	0,66	$5,2 \times 10^4$	(15)
					$4,7 \times 10^3$	(11)

Aus der photometrisch bestimmten NPA-Verdrängung vom

HSA (in Natriumphosphatpuffer; pH 7,4 ; 37 °C) wurde mit Hilfe der modifizierten Dixon-Auftragung und der Hill-Auftragung K_A für die jeweilige Ligandenbindung berechnet. n ist der Hill-Koeffizient. Bei mit π gekennzeichneten Substanzen wurde die Verdrängung bei 20 °C gemessen.

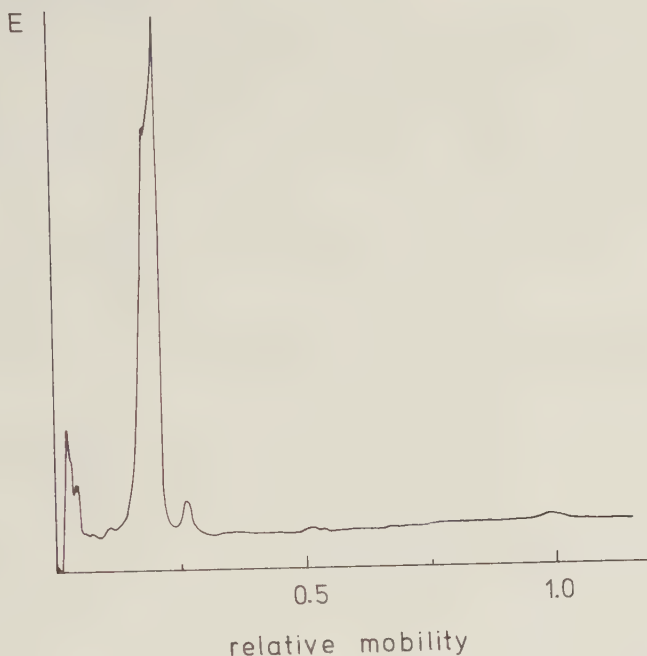
- (1) FEHSKE et al. (1982) (67 mM Phosphatpuffer; 25 °C; Gleichgewichtsdialyse)
- (2) ELBARY et al. (1982) (Gleichgewichtsdialyse)
- (3) MAES et al. (1979) (0,1 M Natriumphosphatpuffer; 37 °C; Fluoreszenzmessungen)
- (4) COULSON und SMITH (1981) (50 mM Phosphatpuffer; 37 °C; Gleichgewichtsdialyse)
- (5) EKMAN et al. (1980) (0,1 M KCl mit 5 mM Natriumphosphat; 24 °C; CD-spektropolarimetrische Titration)
- (6) MASON und McQUEEN (1974) (37 °C; Ultrafiltration)
- (7) OZEKI und TEJIMA (1977) (0,16 M Phosphatpuffer; 37 °C; dynamische Dialysetechnik; BSA)
- (8) OTAGIRI und PERRIN (1977) (0,1 M Phosphatpuffer; 22 °C; CD-Messungen von kompetitiver Salicylatverdrängung)
- (9) aus dem Übersichtsartikel von VALLNER (1977)
- (10) NAKANO et al. (1979) (0,05 M Trispuffer mit 0,1 M NaCl; 3,3 °C; Affinitätschromatographie)
- (11) aus dem Übersichtsartikel von PETERS (1975) (25 °C)
- (12) KRAGH-HANSEN (1983) (33 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7,0 ; 20 °C; Ultrafiltration)
- (13) MEANS et al. (1982)
- (14) O'REILLY (1973) (27 °C; Gleichgewichtsdialyse)
- (15) LANDAU et al. (1977) (25 °C; kalorimetrische Titration)

Falls nicht anders ausgeführt wurde in allen Arbeiten bei pH 7,4 gemessen.

So verbleibt zu deren Deutung die Annahme einer meist geringen negativen Kooperativität bei der Bindung dieser Liganden (KOSHLAND, 1970).

In Übereinstimmung mit OZEKI und TEJIMA (1977) sowie BÜCH und BÜCH (1977) geht auch in dieser Arbeit die in der Reihenfolge Barbital - Phenobarbital - Hexobarbital - Thiopental zunehmende Affinität zu HSA (Tab.2) parallel zu der Einteilung in lang bis kurz wirkende Barbiturate.

Abb.44 Gelelektrophorese von HSA



Auf Weber/Osborn- Gele wurde 20 µg des in dieser Arbeit verwendeten HSA aufgetragen.

Die sigmoidale Kurvenform in Abb.28 läßt auf positive Kooperativität bei der NPA-Verdrängung durch Dicumarol schließen. Der Hill-Koeffizient, der gewöhnlich an der Stelle bestimmt wird, bei der $\log(Y/1-Y)=0$ (SEGEL, 1975), bestätigt mit $n=2,22$ diese Folgerung (SEGEL, 1975 sowie KOSHLAND, 1970) und zeigt an, daß mindestens drei Bindungsstellen für Dicumarol am HSA existieren (SEGEL, 1975).

Für die Warfarinstelle folgt aus der Hill-Auftragung $K_A = 3,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem von FEHSKE et al. (1979b) durch Gleichgewichtsdialyse erhaltenen, nach dem für Dicumarol, neben mehreren sekundären, drei hochaffine Bindungsstellen am HSA existieren mit einer durchschnittlichen

Assoziationskonstante $K_A = 7,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam CHIGNELL (1970) ebenfalls durch Gleichgewichtsdialyse. Er beschreibt drei hochaffine ($K_A = 7,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) und eine unbestimmte Anzahl Bindungsstellen niedriger Affinität. Von den primären Stellen konnte eine als die hier untersuchte Warfarin- und eine andere als die Benzodiazepin-stelle identifiziert werden (FEHSKE et al., 1979b und SJÖHOLM et al., 1979).

Für die in Kapitel 4.2.6 ausgeführte überraschend einfache Beschreibbarkeit, nach der die NPA-Verdrängung formal durch kompetitive Dicumarolbindung approximiert werden kann, in die jedoch statt der Dicumarolkonzentration deren Quadrat eingeht, steht noch eine Deutung aus.

Die NPA-Verdrängung durch Cloxacillin und Dicloxacillin weist eine von den strukturell nahe stehenden Substanzen Methicillin und insbesondere Oxacillin (Abb.33 und 34) abweichende Kurvenform auf und ist in zwei Abschnitte teilbar. Der erste Abschnitt ist, ähnlich der Verdrängung durch Dicumarol, formal durch die zu NPA kompetitive Bindung dieser Liganden approximierbar, in die jedoch statt der Konzentration der Liganden hier deren Quadratwurzel eingeht. Der zweite Abschnitt läßt sich, wie bei den anderen Liganden, durch kompetitive Bindung beschreiben.

Der Verlauf der Kurven in der Hill-Auftragung und die niedrigen Hill-Koeffizienten (Abb.36) weisen auf eine deutliche negative Kooperativität bei der Bindung dieser Liganden hin (SEGEL, 1975 und KOSHLAND, 1970).

Die aus modifizierten Dixon-Auftragungen des zweiten Abschnittes und Hill-Auftragungen stammenden Assoziationskonstanten für Dicloxacillin ($K_A = 2,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ beziehungsweise $K_A = 3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) und Cloxacillin (beide ergeben $K_A = 6,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) liegen in der Größenordnung von kalorimetrisch bestimmten Konstanten für Dicloxacillin ($K_A = 6,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) und Cloxacillin ($K_A = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (LANDAU et al., 1977).

Auch hier steht für die mathematische Beschreibung der NPA-Verdrängung eine nähere Deutung noch aus.

6 ZUSAMMENFASSUNG

NPA ist ein spezifischer Ligand der Warfarinstelle (=Stelle I) des HSA und kann zu einer leicht durchführbaren und empfindlichen photometrischen Bestimmung der Affinitäten anderer Liganden speziell zu dieser Stelle dienen. Dazu wurde mit der modifizierten Dixon-Auftragung ein geeignetes Verfahren zur Verarbeitung der Meßdaten vorgestellt. Die Affinität von NPA zur beobachteten Stelle beruht wahrscheinlich zum größten Teil auf Wasserstoffbrückenbindung.

An einer kleinen Auswahl von Wirksubstanzen wurde exemplarisch die für deren Pharmakokinetik wichtige Ermittlung einer Bindungsstelle am HSA mit dazugehöriger Assoziationskonstanten vorgenommen. Dabei ergaben sich für Dicumarol, Cloxacillin und Dicloxacillin überraschende Resultate, die auf positive Kooperativität innerhalb des HSA bei der Bindung von Dicumarol und deutliche negative Kooperativität bei Cloxacillin- und Dicloxacillinbindung schließen lassen und noch einer weitergehenden Deutung bedürfen.

Durch Photoaffinitätsmarkierung mit ^3H -NPA konnte gezeigt werden, daß die Stelle I innerhalb der ersten fünf Albumindoppelschleifen liegt. HSA-Modifikation durch NPS läßt auf einen Einfluß von Trp 214 auf die Warfarinstelle schließen.

7 LITERATUR

- BERDE, C.B., HUDSON, B.S., SIMONI, R.D., SKLAR, L.A.,
J. Biol. Chem. 254: 391-400 (1979)
- BOCCU, E., VERONESE, F.M., FONTANA, A., BENASSI, C.A.,
Eur. J. Biochem. 13: 188-192 (1970)
- BOOBIS, S.W., CHIGNELL, C.F.,
Biochem. Pharmacol. 28: 751-756 (1979)
- BOWMER, C.J., LINDUP, W.E.,
Biochem. Pharmacol. 27: 937-942 (1978)
- BROWN, J.R.,
Federation Proc. 35: 2142-2144 (1976)
- BÜCH, H.P., BÜCH, U.,
Hypnotika und Sedativa, in: Allgemeine und spezielle
Pharmakologie und Toxikologie, Hrsg.: FORTH, W.,
HENSCHLER, D., RUMMEL, W., 2. Aufl., B.I.-Wissenschafts-
verlag, Mannheim/Wien/Zürich, 1977, pp.402-410
- CHAKRABARTI, S.K.,
Biochem. Pharmacol. 27: 2957-2959 (1978)
- CHIGNELL, C.F.,
Mol. Pharmacol. 6: 1-12 (1970)
- CHIGNELL, C.F., STARKWEATHER, D.K.,
Mol. Pharmacol. 7: 229-237 (1971)
- CHOU, D., POLNASZEK, C.F., YOST, Y., LEPIK, I.E., HOLZMAN,
J.L., Mol. Pharmacol. 20: 674-680 (1981)
- COULSON, C.J., SMITH, V.J.,
Methodol. Surv. 10: 210-213 (1981)
- EKMAN, B., SJÖDIN, T., SJÖHOLM, I.,
Biochem. Pharmacol. 29: 1759-1765 (1980)
- ELBARY, A.A., VALLNER, J.J., WHITWORTH, C.W.,
J. Pharm. Sci. 71: 241-244 (1982)
- FEHSKE, K.J., MÜLLER, W.E., WOLLERT, U.,
Biochim. Biophys. Acta 577: 346-359 (1979a)
- FEHSKE, K.J., MÜLLER, W.E., WOLLERT, U.,
Mol. Pharmacol. 16: 778-789 (1979b)
- FEHSKE, K.J., MÜLLER, W.E., WOLLERT, U.,
Biochem. Pharmac. 30: 687-692 (1981)

- FEHSKE, K.J., SCHLÄFER, U., WOLLERT, U., MÜLLER, W.E.,
Mol. Pharmacol. 21: 387-393 (1982)
- FELDHOF, R.C., PETERS, T., Jr.,
Biochemistry 14: 4508-4514 (1975)
- FISCHER, K.,
Morbus haemolyticus neonatorum und Hyperbilirubinämie,
in: Kinderheilkunde, Hrsg.: VON HARNACK, G.A., 5. Aufl.,
Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 1980, pp. 47-52
- GAMBHIR, K.K., McMENAMY, R.H., WATSON, F.,
J. Biol. Chem. 250: 6711-6719 (1975)
- GORNALL, A.G., BORDAVILL, C.J., DAVID, M.M.,
J. Biol. Chem. 177: 751-766 (1949)
- HANSTEIN, W.G.,
Methods in Enzymology 56: 653-683 (1979)
- HANSTEIN, W.G., HATEFI, Y., KIEFER, H.,
Biochemistry 18: 1019-1025 (1979)
- HAWKINS, D., PINCKARD, N., CRAWFORD, I.P., FARR, R.S.,
J. Clin. Invest. 48:536-542 (1969)
- HECK, H.d'A.,
J. Amer. Chem. Soc. 93:23-29 (1971)
- IKEDA, K., KURONO, Y., OZEKI, Y., YOTSUYANAGI, T.,
Chem. Pharm. Bull. 27:80-87 (1979)
- JACOBSEN, C.,
Eur. J. Biochem. 27:513-519 (1972)
- JACOBSEN, C.,
Biochem. J. 171:453-459 (1978)
- KING, T.P.,
Arch. Biochem. Biophys. 156:509-520 (1973)
- KING, T.P., SPENCER, M.,
J. Biol. Chem. 245: 6134-6148 (1970)
- KOBER, A., JENNER, A., SJÖHOLM, I.,
Biochem. Pharmacol. 27: 2729-2735 (1978)
- KOH, S.-W.M., MEANS, G.E.,
Arch. Biochem. Biophys. 192:73-79 (1979)
- KOSHLAND, D.E., Jr.,
The Molecular Basis for Enzyme Regulation, in: The
Enzymes, 3. Aufl., Hrsg: BOYER, P.D., Academic Press,
New York, 1970, pp. 341-396

- KRAGH-HANSEN, U.,
Biochem. J. 209: 135-142 (1983)
- KURZ, H., NEUMANN, H.-G., FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W., Allgemeine Pharmakologie, in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Hrsg.: FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W., 2. Aufl., B.I.-Wissenschaftsverlag, Mannheim/Wien/Zürich, 1977, pp. 1-72
- LANDAU, M.A., MARKOVICH, M.N., PIRUZYAN, L.A.,
Biochim. Biophys. Acta 493: 1-9 (1977)
- LEE, I.Y., McMENAMY, R.H.,
J. Biol. Chem. 255: 6121-6127 (1980)
- MADSEN, B.W., TEARNE, P.D.,
Life Sciences 26: 173-179 (1980)
- MAES, V., HOEBEKE, J., VERCRUYSSSE, A., KANAREK, L.,
Mol. Pharmacol. 16: 147-153 (1979)
- MÄRKI, H.H.,
Eiweißstoffwechsel, in: Klinische Pathophysiologie, Hrsg. SIEGENTHALER, W., 4. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 1979, pp. 101-125
- MASON, R.W., McQUEEN, E.G.,
Pharmacology 12: 12-19 (1974)
- McLACHLAN, A.D., WALKER, J.E.,
Biochim. Biophys. Acta 536: 106-111 (1978)
- MEANS, G.E., SOLLENNE, N.P., MOHAMED, A.,
Adv. in Chem. Ser., 198, Modif. Proteins: 325-346 (1982)
- MELOUN, B.M., MORAVEK, L., KOSTKA, V.,
Febs Letters 58: 134-137 (1975)
- MUELLER, U.W., POTTER, J.M.,
Biochem. Pharmacol. 30: 727-733 (1981)
- MÜLLER, W.E., WOLLERT, U.,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288: 17-27 (1975)
- MÜLLER, W.E., WOLLERT, U.,
Pharmacology 19: 59-67 (1979)
- NAKANO, N.I., TAKAYUKI, O., FUJIMOTO, Y., AMIYA, T.,
Pharm. Sci. 67: 1005-1008 (1978)
- NAKANO, N.I., OSHIO, T., SATO, N., SHIMAMORI, Y., YAMAGUCHI, S., Chem. Pharm. Bull. 27: 2048-2055 (1979)

- NAKANO, N.I., SHIMAMORI, Y., YAMAGUCHI, S.,
J. Chromatogr. 188: 347-356 (1980)
- O'REILLY, R.A.,
Ann. N. Y. Acad. Sci. 226: 293-308 (1973)
- OZEKI, S., TEJIMA, K.,
Chem. Pharm. Bull. 25: 1952-1958 (1977)
- PETERS, T., Jr.,
Serum Albumin, in: The Plasma Proteins, 2. Aufl.,
Hrsg.: PUTNAM, F.W., Academic Press, New York, 1975,
pp. 133-181
- PETERS, T., Jr.,
Clinical Chemistry 23: 5-12 (1977)
- PETERS, T., Jr., FELDHOFF, R.C.,
Biochemistry 14: 3384-3391 (1975a)
- REED, R.G., FELDHOFF, R.C., CLUTE, O.L., PETERS, T., Jr.,
Biochemistry 21: 4578-4583 (1975)
- SCATCHARD, G.,
The attractions of proteins for small molecules and
ions, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660-672 (1949)
- SEGEL, I.H.,
Enzyme Kinetics, John Wiley & Sons, New York/London/
Sydney/Toronto, 1975
- SJÖDIN, T.,
Biochem. Pharmacol. 26: 2157-2161 (1977)
- SJÖHOLM, I., EKMAN, B., KOBER, A., LJUNGSTEDT-PAHLMAN, I.,
SEIVING, B., SJÖDIN, T., Mol. Pharmacol. 16: 767-777
(1979)
- SOLLENNE, N.P., MEANS, G.E.,
Mol. Pharmacol. 15: 754-757 (1979)
- SOLOMON, H.M., SCHROGIE, J.J., WILLIAMS, D.,
Biochem. Pharmacol. 17: 143-151 (1968)
- SOLTYS, B.J., HSIA, J.C.,
J. Biol. Chem. 253: 3029-3034 (1978)
- STAAB, H.A.,
Einführung in die theoretische organische Chemie,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1959
- SUDLOW, G., BIRKETT, D.J., WADE, D.N.,
Mol. Pharmacol. 12: 1052-1061 (1976)

- TABACHNIK, M., DOWNS, F.J., GIORGIO, N.A.,
Arch. Biochem. Biophys. 136: 467-479 (1970)
- VALLNER, J.J.,
J. Pharm. Sci. 66: 447-465 (1977)
- WALKER, J.E.,
Febs Letters 66: 173-175 (1976)
- WEBER, K., OSBORN, M.,
J. Biol. Chem. 244: 4406-4412 (1969)
- WEISS, C.,
Funktion des Blutes, in: Physiologie des Menschen,
Hrsg.: SCHMIDT, R.F., THEWS, G., Springer-Verlag,
Berlin/Heidelberg/New York, 1977, pp. 318-345
- WHITLAM, J.B., CROOKS, M.J., BROWN, K.F., PEDERSEN, P.V.,
Biochem. Pharmacol. 28: 675-678 (1979)
- WINDHOLZ, M.,
The Merck Index, 9. Aufl., Merck & Co., Inc., Rahway,
N.J., USA, 1976
- WONG, G.B., SELLERS, E.M.,
Biochem. Pharmacol. 28: 3265-3270 (1979)

Ich danke Herrn Prof. W. G. Hanstein
für die Überlassung dieses Themas und
seine Hilfestellung, sowie allen An-
deren, die mich bei der Fertigstellung
dieser Arbeit unterstützt haben.

Lebenslauf

27.2.1959	Geburt als Sohn des Postbeamten Erich August Tomsik und seiner Ehefrau Helene Sophia, geborene Schirm
April 1965	Einschulung in die Overbergschule in Hagen
August 1968	Wechsel auf das Theodor-Heuss-Gymnasium der Stadt Hagen (Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium)
13.6.1977	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
Oktober 1977	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum
August 1979	Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung
August 1980	Bestehen des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
August 1982	Bestehen des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
September 1982 - April 1983	experimentelles Arbeiten in der Arbeitsgruppe für Zellchemie des Institutes für Physiologische Chemie an der Ruhr-Universität Bochum und Formulierung der vorliegenden Schrift
April 1983	Beginn des dritten Abschnittes der ärztlichen Ausbildung im Prosper-Hospital Recklinghausen, akademisches Lehrkrankenhaus der Ruhr-Universität Bochum

